

# LC-MS/MS-Bestimmung von Kokzidiostatika in Futtermittel und Ei

## Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. Nat)  
im Fach Chemie

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Frau Dipl. Lebensmittelchem. Dorina Bodi

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Stefan Hecht

Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Panne

Prof. Dr. Reiner Wittkowski

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2014



---

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2007 bis Dezember 2010 Fachgruppe Kontaminanten, Abteilung Sicherheit in der Nahrungskette des Bundesinstituts für Risikobewertung durchgeführt.

---



---

## KURZZUSAMMENFASSUNG

Der Einsatz von Kokzidiostatika als Futtermittelzusatzstoffe zur Vorbeugung der Kokzidiose ist in der Kleintiermast von hoher wirtschaftlicher Bedeutung. Zum Schutz der Gesundheit von Mensch und Tier ist die Verwendung der Wirkstoffe in der Europäischen Union gesetzlich geregelt und unterliegt der amtlichen Kontrolle in Lebens- und Futtermitteln. In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden zur flüssigchromatographisch tandem-massenspektrometrischen (LC-MS/MS-) Bestimmung von Kokzidiostatika in Futtermitteln und in Ei entwickelt. Vor allem in niedrigen Konzentrationsbereichen wurde die Qualität der Analysenergebnisse durch Bestandteile des Probenmaterials stark beeinträchtigt. Die Untersuchung solcher durch Matrixbestandteile verursachter Effekte wird in der Analytik pharmazeutischer Produkte in biologischen Flüssigkeiten sowie in der Pestizidanalytik durchgeführt. Bisher gibt es kaum Daten zu Matrixeffekten bei der LC-MS/MS-Analytik in Futtermitteln. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war deshalb die systematische Untersuchung verschiedener Einflussfaktoren auf die beobachteten Matrixeffekte bei der Analyse von Kokzidiostatika, aber auch der antimikrobiellen Leistungsförderer Carbadox und Olaquinox. Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse wurde eine Methode zur Bestimmung von Verschleppungen der als Futtermittelzusatzstoffe zugelassenen Kokzidiostatika in Nicht-Zieltierarten ohne Probenaufreinigungsschritt entwickelt und validiert. Auf dieser Grundlage wurden zur Durchführung einer Carry-over-Studie Methoden für die Bestimmung des Kokzidiostatikums Maduramicin in Futtermitteln, Eiweiß und Eigelb weiter optimiert und validiert. In der durchgeführten Fütterungsstudie mit Legehennen wurde der Carry-over von Maduramicin aus dem Futtermittel in das Hühnerei charakterisiert. Futtermittel mit drei Konzentrationen von Maduramicin bis zum festgelegten Höchstgehalt in Futtermittel für Nicht-Zieltierarten wurden dazu hergestellt und an jeweils eine Gruppe von zehn Legehennen über 21 Tage verabreicht. Der Übergang des Wirkstoffes in das Eiweiß im Vergleich zu dem ins Eigelb war vernachlässigbar. Die ermittelte Carry-over-Rate von 8 % ergab sich allein aus dem Transfer Maduramicins in das Eigelb. Der für Eier festgelegte Maduramicin-Höchstgehalt von 2 µg/kg wurde bei der Fütterung aller drei Maduramicin-Konzentrationen im Futtermittel überschritten, obwohl diese unterhalb des festgelegten Höchstgehaltes für Futtermittel lagen. Als Folge dieser Ergebnisse wurde der Maduramicin-Höchstgehalt in Ei durch die Europäische Kommission auf 12 µg/kg angepasst. Der in Verordnung (EG) Nr. 124/2009 festgelegte Höchstgehalt wurde durch die Verordnung (EU) 610/2012 geändert.



---

## ABSTRACT

Prevention of coccidiosis by anticoccidial feed additives is of great economic importance in poultry farming. Application of these substances is regulated by European law in order to protect human health, animal health and the environment. It is a matter of official feed and food control to ensure compliance with respective regulations, thus requiring appropriate determination methods for coccidiostats. In the present study, liquid chromatographic tandem mass spectrometric (LC-MS/MS-) methods for the quantification of authorized coccidiostats in feed and eggs were developed. In case of low analyte concentrations the influence of the sample material resulted in poor method performance. These matrix effects are intensively investigated in other analytical fields like drug analysis in biological fluids or the determination of pesticides in fruits and vegetables. In contrast, there are very limited data concerning matrix effects in LC-MS/MS analysis of different compounds in feedingstuffs. This study therefore focussed on the systematic investigation of factors influencing matrix effects during analysis of coccidiostats as well as the antimicrobial growth promoters carbadox and olaquinox. The findings were implemented in the development and validation of a method for the determination of cross-contamination levels of authorized coccidiostats in feed for non-target animals. This method was optimized and validated for the determination of the anticoccidial feed additive maduramicin in feed, egg white, and egg yolk for a carry-over study. By means of the conducted feeding trial with laying hens the carry-over of maduramicin from feed into eggs was comprehensively characterized. Three feedingstuffs containing different levels of maduramicin up to the maximum tolerable level in non-target animal feed were prepared and fed to groups of ten laying hens each for 21 days. Carry-over of maduramicin into egg white was negligible compared to egg yolk. Therefore, the determined carry-over rate of 8 % resulted exclusively from the transfer of maduramicin into egg yolk. Although the three applied diets were in compliance with the maximum level in feed, in each subtrial the resulting concentrations in whole eggs exceeded the stipulated maximum level in eggs. As a consequence of these findings, the maximum permitted level of maduramicin in eggs was adapted to 12 µg/kg by the European Commission. The maximum level assigned by Regulation (EC) No. 124/2009 was amended in Regulation (EU) 610/2012.





# Inhaltsverzeichnis

<b>Kurzzusammenfassung</b>	<b>I</b>
<b>Abstract</b>	<b>III</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretische Grundlagen</b>	<b>3</b>
2.1 Kokzidiostatika . . . . .	3
2.1.1 Eigenschaften von Kokzidiostatika . . . . .	4
2.1.2 Wirkungsweise, Toxikologie und Resistenzbildung . . . . .	6
2.1.3 Kreuzkontamination von Futtermitteln . . . . .	8
2.1.4 Vorkommen von Kokzidiostatika in Hühnereiern . . . . .	10
2.1.5 Analytik von Kokzidiostatika in Futtermittel und im Ei . . . . .	11
2.2 Carbadox und Olaquinox . . . . .	15
2.2.1 Bedeutung und Eigenschaften von Carbadox und Olaquinox . . . . .	15
2.2.2 Analytik von Carbadox und Olaquinox in Futtermitteln . . . . .	16
2.3 LC-MS/MS und Matrixeffekte . . . . .	17
2.3.1 Theorie der LC-MS/MS-Technik . . . . .	17
2.3.2 Matrixeffekte in der LC-MS/MS – Definition, Ursachen und Auswirkungen . . . . .	19
2.3.3 Methoden zur Untersuchung von Matrixeffekten in der LC-MS/MS . . . . .	20
2.4 Carry-over von Substanzen aus dem Futtermittel in das Hühnerei . . . . .	22
2.4.1 Untersuchung des Carry-over von Kokzidiostatika aus dem Futtermittel in das Hühnerei . . . . .	23
<b>3 Experimenteller Teil</b>	<b>25</b>
3.1 Bestimmung von Kokzidiostatika mit LC-MS/MS . . . . .	25
3.1.1 Ermittlung der MS/MS-Parameter . . . . .	25
3.1.2 Entwicklung der HPLC-Methode . . . . .	26
3.1.3 Optimierung der Ionisationsparameter . . . . .	27
3.1.4 Weitere Optimierungsschritte . . . . .	27
3.2 Extraktion von Kokzidiostatika aus Futtermitteln zur Untersuchung der Matrixeffekte . . . . .	28
3.2.1 Accelerated Solvent Extraction – ASE . . . . .	28
3.2.2 Extraktion im Überkopfschüttler (SLE) und im Ultraschallbad (USE) . . . . .	29
3.2.3 Behandlung der Rohextrakte . . . . .	29

3.3	Extraktion von Eiweiß, Eigelb und Gesamtei zur Untersuchung von Matrixeffekten (Kokzidiostatika-Multimethode) . . . . .	30
3.4	Probenaufreinigung zur Untersuchung von Matrixeffekten (Kokzidiostatika-Multimethode) . . . . .	30
3.4.1	Dispersive Festphasenextraktion (dispersive solid phase extraction – dSPE) . . . . .	30
3.4.2	Festphasenextraktion - Strata X polymer reversed phase . . . . .	31
3.4.3	Festphasenextraktion – Oasis HLB . . . . .	31
3.4.4	Fraktionierung mittels Größenausschlusschromatographie . . . . .	32
3.5	Entwicklung der Methoden zur Bestimmung von Maduramicin in Futtermittel, Eiweiß und Eigelb . . . . .	33
3.5.1	LC-MS/MS-Methodenentwicklung . . . . .	33
3.5.2	Probenaufarbeitung . . . . .	34
3.6	Bestimmung von Carbadox und Olaquinox in Futtermitteln . . . . .	36
3.6.1	LC-MS/MS-Methode . . . . .	36
3.6.2	Probenaufarbeitung von Futtermittel zur Untersuchung der Matrixeffekte . . . . .	36
3.7	Untersuchung von Matrixeffekten . . . . .	38
3.7.1	Pre und post extraction addition nach Matuszewski et al. . . . .	38
3.7.2	Postcolumn Infusion . . . . .	38
3.8	Methodenvalidierung . . . . .	39
3.8.1	Bestimmung von Kokzidiostatika in Futtermitteln (Kontrolle der Höchstgehalte für Verschleppungen in Futtermittel für Nicht-Zieltierarten) . . . . .	39
3.8.2	Bestimmung von Maduramicin in Futtermittel, Eiweiß und Eigelb mittels LC-MS/MS zur Untersuchung des Carry-over . . . . .	43
3.9	Durchführung der Carry-over-Studie . . . . .	44
3.9.1	Voraussetzungen . . . . .	44
3.9.2	Herstellung und Homogenitätsprüfung der Futtermittelmischungen . . . . .	45
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion - Matrixeffekte</b>	<b>48</b>
4.1	Endogene Matrixeffekte . . . . .	48
4.1.1	Einfluss der Extraktionstechnik und Extraktionslösungsmittel am Beispiel der Extraktion von Futtermitteln . . . . .	48
4.1.2	Einfluss des Analyten . . . . .	54
4.1.3	Einfluss von Art und Zustand der Matrix . . . . .	57
4.1.4	Einfluss der Probenaufreinigung . . . . .	60
4.1.5	Matrixstärke – Aufkonzentrieren und Verdünnen . . . . .	73
4.2	Exogene Matrixeffekte . . . . .	74
4.3	Weitere Einflussfaktoren auf den Matrixeffekt . . . . .	75
4.3.1	Einfluss des LC-MS/MS-Gerätes . . . . .	75
4.3.2	Einfluss der MS-Messbedingen am Beispiel des gewählten Molekül-Addukt-Ions - Vergleich der $[M+NH_4]^+$ - und $[M+Na]^+$ -Precursor-Ionen . . . . .	77

---

4.3.3	Einfluss des Trennsäulenmaterials auf den ermittelten Matrixeffekt	78
4.3.4	Interne Standardsubstanzen zur Korrektur von Matrixeffekten – strukturverwandte oder isotoopenmarkierte interne Standards? . . .	80
4.4	Matrixeffektuntersuchungen – Aussagekraft und Vergleichbarkeit der Me- thoden . . . . .	81
4.5	Reduktion von und Umgang mit Matrixeffekten . . . . .	82
4.6	Validierung der Multimethode zur Bestimmung von 11 Kokzidiostatika zur Kontrolle der Höchstgehalte für die Verschleppung in Futtermittel für Nicht-Zieltierarten . . . . .	85
4.6.1	Überprüfung der Linearität des Arbeitsbereiches . . . . .	85
4.6.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenze . . . . .	86
4.6.3	Wiederfindung und Präzision . . . . .	87
4.6.4	Robustheit der Methode – Einfluss des Bearbeiters . . . . .	90
4.6.5	Fazit Multimethode . . . . .	91
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion – Maduramicin-Carry-over</b>	<b>92</b>
5.1	Validierung der Methoden zur Bestimmung von Maduramicin in Futter- mittel, Eiweiß und Eigelb . . . . .	92
5.1.1	Ermittlung des linearen Arbeitsbereiches . . . . .	92
5.1.2	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen . . . . .	93
5.1.3	Wiederfindung und Präzision . . . . .	93
5.2	Carry-over von Maduramicin aus dem Futtermittel in das Ei . . . . .	98
5.2.1	Aufbau und Ablauf des Fütterungsversuches . . . . .	98
5.2.2	Herstellung des Futtermittels mit definiertem Maduramicin-Gehalt	99
5.2.3	Analyse der Futtermittel-Kontrollproben und der anfallenden Fut- termittelreste . . . . .	101
5.2.4	Analyse der Eiweiß-Proben . . . . .	107
5.2.5	Analyse der Eigelb-Proben . . . . .	107
5.2.6	Eigelbproben des ersten Teilversuchs mit 10 µg/kg-Futtermittel . .	107
5.2.7	Berechnung der Maduramicin-Gehalte im Gesamtei . . . . .	110
5.2.8	Ermittlung der Carry-over-Rate und des Transferfaktors . . . . .	112
5.2.9	Carry-over von Maduramicin im Vergleich zu anderen Kokzidio- statika . . . . .	114
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>117</b>
<b>7</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>123</b>
7.1	Lösungsmittel und Chemikalien . . . . .	123
7.2	Standardsubstanzen . . . . .	123
7.3	Lösungen . . . . .	124
7.4	Probenmaterial . . . . .	124
7.5	Geräte . . . . .	125
7.6	Verbrauchsmaterial . . . . .	125
7.7	Methodenparameter . . . . .	126

---

<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>137</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>154</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>156</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>157</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>159</b>
<b>Danksagung</b>	<b>161</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

HPLC	High performance liquid chromatography
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry
ESI	Electrospray ionization
API	Atmospheric pressure ionization
CBX	Carbadox
OQX	Olaquinox
PCI	Postcolumn infusion
SPE	Solid phase extraction
SLE	Solid-liquid extraction
USE	Ultraschallextraktion
ASE	Accelerated Solvent Extraction (Beschleunigte Lösemittlextraktion)
LLE	Liquid-liquid extraction
XIC	Extracted ion chromatogram
TIC	Total ion chromatogram
RE	Recovery (Wiederfindung)
ME	Matrix effect (Matrixeffekt)
PE	Process efficiency (Prozesseffizienz)



## 1 Einleitung und Zielsetzung

Tierische Lebensmittel wie Milch, Eier und Fleisch spielen eine große Rolle in der menschlichen Ernährung. Die Deckung des Bedarfs an diesen Lebensmitteln ist nur durch Intensivtierhaltung zu gewährleisten. Futtermittelzusatzstoffe sind in diesem System von wesentlicher Bedeutung für die Produktqualität und -quantität und vor allem auch für die Tiergesundheit. Neben der Deckung des Ernährungsbedarfs der Tiere, der Verbesserung der Lagerfähigkeit und der Verdaulichkeit des Futters dienen Futtermittelzusatzstoffe auch zur Vorbeugung von Erkrankungen wie der in der Geflügelmast verbreiteten parasitären Infektionskrankheit Kokzidiose. Die Zulassung und der Einsatz von Zusatzstoffen in der Tierernährung sind in der Europäischen Gemeinschaft gesetzlich geregelt [1]. Die Substanzen oder eventuelle Rückstände in Lebensmitteln tierischen Ursprungs dürfen sich nicht schädlich auf die Gesundheit von Mensch und Tier oder auf die Umwelt auswirken. Die Überprüfung der Einhaltung dieser und anderer des Lebensmittel- und Futtermittelrecht betreffender Bestimmungen erfolgt durch amtliche Kontrollen [2]. Für die damit verbundenen Untersuchungen von Lebens- und Futtermitteln sind geeignete Analysemethoden erforderlich. So sind zum Nachweis und zur Quantifizierung von Rückständen in Lebens- und Futtermitteln Techniken mit hoher Spezifität und niedrigen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erforderlich. Eine Technik, welche diese Voraussetzungen erfüllt und deshalb in vielen Bereichen der Rückstandsanalytik in Lebens- und Futtermitteln eingesetzt wird, ist die Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) [3-6]. Zunehmend wird jedoch auch über die Grenzen der LC-MS/MS-Analytik, vor allem in komplexen Matrices, berichtet. Die Einschätzung von Matrixeffekten auf das Analyseergebnis ist immer häufiger Teil der Entwicklung von Methoden, besonders bei der LC-MS/MS.

In der vorliegenden Arbeit sollte die LC-MS/MS zur Bestimmung der als Futtermittelzusatzstoffe zugelassenen Kokzidiostatika in Futtermittel und in Ei angewendet werden. Ziel war zunächst die Quantifizierung der Substanzen im einstelligen ppb-Bereich. Die Methode sollte zur Untersuchung von Verschleppungen dieser Stoffe in Futtermittel für Nichtzieltierarten und des daraus resultierenden des Transfers verschiedener Kokzidiostatika aus dem Futtermittel in das Ei der Legehenne dienen. Zu Beginn der Arbeiten der vorliegenden Dissertation waren keine Höchstgehalte für Kokzidiostatika in Futtermitteln für Nicht-Zieltierarten und in tierischen Lebensmitteln als Folge der Verschleppung in Futtermittel festgelegt. Daraus ergab sich eine sogenannte Nulltoleranz für Kokzidiostatika in diesen Matrices, sodass die zu entwickelnde Methode möglichst niedrige Nachweis- und Bestimmungsgrenzen aufweisen sollte. Bei der quantitativen Bestimmung in den komplexen Matrices Futtermittel und Ei waren Störungen durch Matrixeffekte zu erwarten und sollten im Rahmen der Methodenentwicklung ausführlich betrachtet werden.

Bei der Entwicklung der Kokzidiostatika-Multimethode sollten einzelne Parameter und Teilschritte der Methode auf ihren möglichen Anteil am Auftreten von Matrixeffekten untersucht werden. Mit Hilfe etablierter Methoden zur Untersuchung von Matrixeffekten sollten verschiedene Extraktionstechniken und -lösungsmittel sowie Aufreinigungsmethoden für Futtermittel und für Ei verglichen werden. Zusätzlich sollte der

Einfluss von HPLC-Parametern auf das Analytsignal erfasst werden und die Erkenntnisse zur Erhöhung der Leistungsfähigkeit der Methode umgesetzt werden. Vergleichend sollten außerdem die Matrixeffekte untersucht werden, die bei der LC-MS/MS-Analyse der verbotenen antibiotischen Leistungsförderer Carbadox und Olaquinox in verschiedenen Futtermitteln auftreten. Grund dafür war die Beobachtung mangelnder Präzision der Analysenergebnisse bei der Quantifizierung dieser Substanzen, die strukturelle Ähnlichkeiten mit Vertretern der chemischen Kokzidiostatika aufweisen.

Im Laufe der Bearbeitungszeit wurden Höchstgehalte für Kokzidiostatika in Futtermitteln für Nicht-Zieltierarten und daraus resultierende Rückstände in Eiern festgelegt. Daraus ergaben sich konkrete, mit den Höchstgehalten verbundene Anforderungen an die Kokzidiostatika-Multimethode und zusätzliche Fragestellungen. In Abhängigkeit vom Kokzidiostatikum musste die Methode im Konzentrationsbereich von 50 µg/kg bis 1,25 mg/kg Futtermittel validiert werden. Die für das Hühnerei festgelegten Höchstgehalte lagen zwischen 2 µg/kg und 5 µg/kg. Mit Veröffentlichung der Höchstgehalte wurde gleichzeitig deren Überprüfung eingefordert, da keine Daten wissenschaftlicher Studien zum Carry-over, also zum Transfer der Wirkstoffe aus dem Futtermittel in die Lebensmittel, zugrunde lagen. Die Höchstgehalte beruhten auf Abschätzungen des Carry-over in das Hühnerei anhand der für andere pharmakologisch wirksame Substanzen bekannten Carry-over-Raten. Durch die Ermittlung substanzspezifischer Carry-over-Raten können wissenschaftlich gesicherte Höchstgehalte für Futtermittel und für Eier zum Schutz des Verbrauchers festgelegt werden. Damit werden Sicherheitsfaktoren aufgrund einer fehlenden Datenbasis unnötig.

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war deshalb die Untersuchung des Transfers eines ausgewählten Kokzidiostatikums, Maduramicin, aus kontaminiertem Legehennenfutter in das Hühnerei. Im Fall von Maduramicin war das Verhältnis zwischen dem festgelegten Höchstgehalt für Verschleppungen in Futtermittel für Nichtzieltierarten (50 µg/kg) [7] und dem Höchstgehalt im Ei (2 µg/kg) [8] gering im Vergleich zu den anderen Kokzidiostatika. Dies ist durch die höhere kokzidiostatische Wirkung des Maduramicins begründet. Trotz der bei Einhaltung des Höchstgehaltes von Maduramicin geringen Belastung der Futtermittel wurde von Überschreitungen des Höchstgehaltes im Ei berichtet. [9] Eine Bestätigung dieser Daten in weiteren Untersuchungen sollte die Überprüfung und gegebenenfalls Korrektur der Höchstgehalte in Richtlinie 2009/8/EG notwendig machen. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Studie sollte dafür statistisch gesicherte Daten liefern. Dazu wurde ein Fütterungsversuch mit Legehennen und Futtermitteln mit drei Verschleppungskonzentrationen an Maduramicin bis zum festgelegten Höchstgehalt (10 µg/kg, 30 µg/kg, 50 µg/kg) durchgeführt. Die Quantifizierung von Maduramicin in Futtermittel, Eiweiß und Eigelb erfolgte mit einer für diesen Zweck entwickelten und validierten Bestimmungsmethode. Die benötigten Futtermittel sollten im Rahmen der Arbeit hergestellt, homogenisiert und auf Homogenität geprüft werden. Außerdem wurde die Maduramicin-Konzentration in den Futtermitteln über den gesamten Versuchszeitraum kontrolliert. Die produzierten Eier wurden während des Fütterungszeitraums und darüber hinaus gesammelt und auf den Maduramicin-Gehalt untersucht. Die ermittelten Daten sollten dann zur Charakterisierung des carry-over von Maduramicin aus dem Futtermittel in das Hühnerei herangezogen werden. Dazu



gehörte die Bestimmung der Carry-over-Rate und der Verteilung des Wirkstoffes in den Eibestandteilen. Der Carry-over von Maduramicin wurde in dieser Arbeit erstmalig umfassend untersucht.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Kokzidiostatika

Kokzidiostatika sind Futtermittelzusatzstoffe, die vor allem in der Geflügelmast zur Vorbeugung der parasitären Krankheit Kokzidiose eingesetzt werden und für diesen Zweck zugelassen sind. Die Erreger dieser Krankheit sind einzellige Parasiten der Gattung *Eimeria*, die sich fast ausschließlich im Darm des Wirtes einnisten. Es sind sieben *Eimeria*-Arten bekannt, welche die Kokzidiose bei Hühnern auslösen. Leichte Symptome einer Infektion sind eine Verminderung des Wachstums, der Futterverwertung sowie der Eiproduktion bei Legehennen. Schwere Infektionen sind mit blutigen Durchfällen verbunden und führen häufig zum Tod des Wirtstieres.

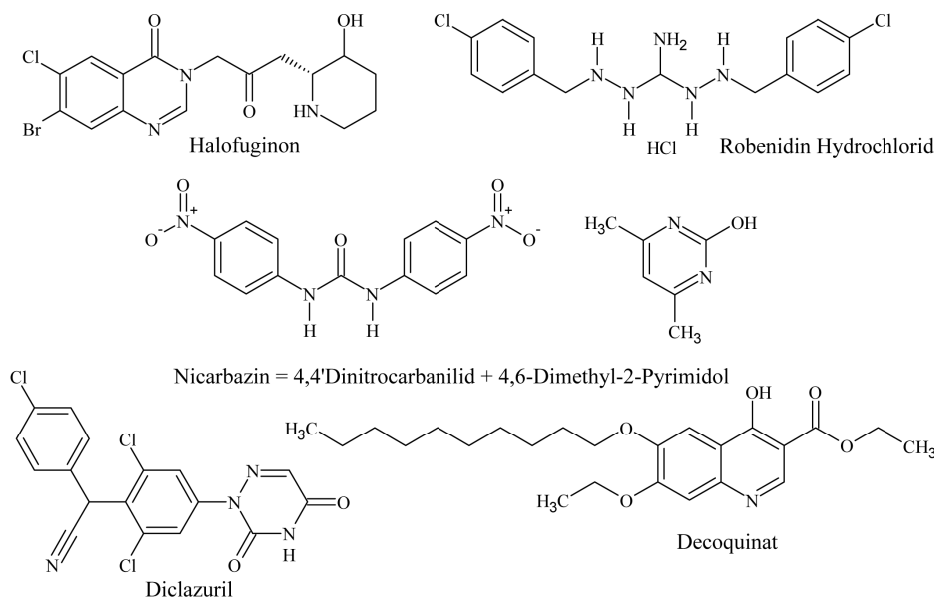
Unter den Bedingungen der heutigen exzessiven Massentierhaltung wird die Vermehrung der Parasiten und damit die Verbreitung der Krankheit besonders begünstigt. Bei einem Ausbruch ist meist der gesamte Tierbestand betroffen. Dadurch entstehen der geflügelproduzierenden Industrie jährlich hohe wirtschaftliche Verluste. Die Behandlung der bereits ausgebrochenen Krankheit ist wirtschaftlich nicht sinnvoll. Der prophylaktische Einsatz von Kokzidiostatika ist deshalb seit vielen Jahren ein wirksames Mittel zur Vermeidung von Ausbrüchen der Krankheit. Im Allgemeinen werden die Wirkstoffe über das Futter, z. T. auch über das Tränkwasser, verabreicht. In Europa sind derzeit 11 Kokzidiostatika als Futtermittelzusatzstoffe zugelassen. Die Zulassung jedes Wirkstoffes gilt nur für die festgelegten Tierarten unter Einhaltung der Höchst- und Mindestgehalte im Alleinfuttermittel und unter Beachtung der vor der Schlachtung vorgeschriebenen Absetzfristen. [1,10]

Die Tierarten, für welche keine Zulassung vorliegt, werden als Nicht-Zieltierarten bezeichnet. Dazu zählen unter anderem Legehennen, da die Möglichkeit der Übertragung der Wirkstoffe in das Hühnerei besteht. Trotzdem werden im Rahmen der amtlichen Lebensmittelkontrolle immer wieder Rückstände von Kokzidiostatika in Eiern nachgewiesen. Mögliche Ursachen dafür sind die illegale Anwendung von Kokzidiostatika-haltigem Futter und die unbeabsichtigte Kontamination von Legehennenfutter mit den Wirkstoffen. Diese Kontamination erfolgt bei der Herstellung der Futtermittel, da kokzidiostatikafreie und kokzidiostatika-haltige Futtermittel in denselben Produktionsanlagen hergestellt werden. Die als Kreuzkontamination bezeichnete Verschleppung der Wirkstoffe in Futtermittel für Nicht-Zieltierarten ist technisch unvermeidbar, wenn Futtermittel für Zieltierarten und Nicht-Zieltierarten in derselben Anlage hergestellt werden. Die Verwendung getrennter Produktionsanlagen ist jedoch ökonomisch unattraktiv. Deshalb wurden in der Europäischen Union sowohl für die sogenannte Kreuzkontamination des Futtermittels für Nicht-Zieltierarten als auch für die daraus resultierenden Rückstände von Kokzidiostatika in Eiern Höchstgehalte festgelegt. [7,8] Die Kontrolle der Einhaltung dieser Höchstgehalte ist eine wichtige Aufgabe im Rahmen des Verbraucherschut-

zes. Außerdem sind repräsentative Daten zum Vorkommen von unerwünschten Stoffen oder Kontaminanten erforderlich, um eine mögliche Gefahr für den Verbraucher abzuschätzen. Dazu sind geeignete Methoden zum Nachweis und zur Quantifizierung dieser Substanzen notwendig. Derzeit wird zur Bestimmung von Kokzidiostatika am häufigsten die Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) eingesetzt. Die Anfälligkeit dieser Methode gegenüber Störungen durch das Probenmaterial und andere Komponenten ist bekannt und wurde in vielen Arbeiten untersucht. Konkrete chemisch-physikalische Prozesse, welche die Messung beeinflussen, wurden jedoch bis heute nicht aufgeklärt.

### 2.1.1 Eigenschaften von Kokzidiostatika

Die derzeit als Futtermittelzusatzstoffe zugelassenen Kokzidiostatika können anhand ihrer Struktur und ihrer Wirkungsweise in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die chemischen Kokzidiostatika, Decoquinat, Diclazuril, Halofuginon Hydrobromid, Nicarbazin und Robenidin Hydrochlorid sind synthetische Substanzen (Abbildung 1).

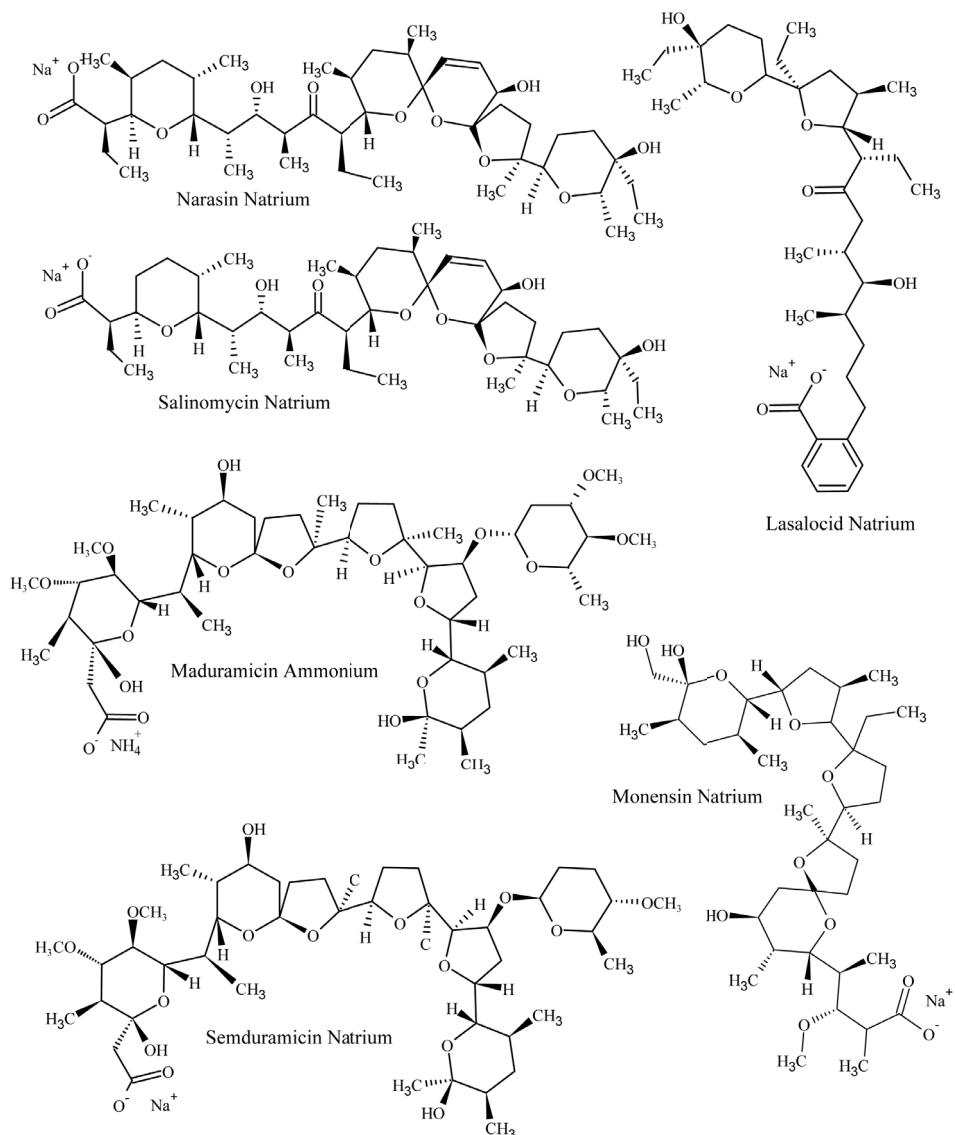


**Abbildung 1:** Strukturformeln der chemischen Kokzidiostatika

Sie bestehen aus verschiedenen aromatischen, z.T. stickstoffhaltigen oder halogenierten Grundgerüsten wie Benzol, Pyrimidin, Triazin, Chinolin oder Chinazolin. Diese sind mit verschiedenen Substituenten wie aliphatische Seitenketten, Amino-, Nitril-, Hydroxyl- und Carboxylsäuregruppen verbunden.

Die Ionophore sind natürlich vorkommende, von Mikroorganismen gebildete Substanzen. Lasalocid, Maduramicin, Monensin, Narasin, Salinomycin und Semduramicin sind aus mehreren Polyetherringen aufgebaut (siehe Abbildung 2). Der Begriff Ionophor stammt vom griechischen ion „Ion“ und phore „Träger oder Überträger“. Per Defini-

tion handelt es sich hierbei um Stoffe, die lipophile, wieder auflösbare Komplexe mit Kationen bilden und diese Ionen durch biologische Membranen transportieren können. Meist werden Alkali- bzw. Erdalkalimetallionen durch Bildung eines Komplexes, in dem die Sauerstoffatome der Etherringe als Liganden dienen, gebunden.



**Abbildung 2:** Strukturformeln der ionophoren Kokzidiostatika

Dabei entsteht eine ringförmige Struktur um das komplexierte Metallion, die durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Carboxylsäuregruppe und Wasserstoffatomen von Hydroxylgruppen des Ionophors geschlossen wird. [11] Alle hier betrachteten Kokzidiostatika sind mit Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten  $\log KOW > 1$  lipophil. Sie sind nicht bzw. nur wenig in Wasser löslich. Gute Lösungsmittel sind Methanol

und Ethanol für die Ionophore. Die chemischen Kokzidiostatika sind nur in stärkeren organischen Lösungsmitteln wie Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid oder Acetonitril mit dem Zusatz organischer Säuren, löslich [12]. Der aprotische Charakter von Acetonitril wird durch den Säurezusatz reduziert und damit die Löslichkeit der Stickstoffheterozyklen erhöht.

### 2.1.2 Wirkungsweise, Toxikologie und Resistenzbildung

Kokzidiostatika werden eingesetzt, um das Wachstum der Protozoen zu hemmen bzw. diese abzutöten. Sie greifen an unterschiedlichen Stellen in den Entwicklungszyklus der Parasitenzellen, der Schizogonie (ungeschlechtlich), Gamogonie (geschlechtlich) und Sporogonie (ungeschlechtlich), ein. Der Wirkmechanismus der Substanzen ist von der jeweiligen Struktur abhängig. Die chemischen Kokzidiostatika greifen auf unterschiedliche Weise in Metabolismusprozesse verschiedener Entwicklungsstadien der Parasitenzelle, ein. Zum Beispiel hemmt Decoquinat die mitochondriale Respiration und den Elektronentransport in der Parasitenzelle. [13] Auch Nicarbazin greift in den mitochondrialen Stoffwechsel ein, indem es die oxidative Phosphorylierung blockiert. [14]

Dagegen beruht die Wirkung der Gruppe der Ionophore auf der Störung des osmotischen Gleichgewichts der Parasitenzelle in deren invasiven Stadium, dem Sporozoit [15]. Die Mehrzahl der ionophoren Kokzidiostatika transportiert vorrangig monovalente Kationen durch die Zellmembranen der Parasiten und verändert dadurch den natürlichen Ionengradienten. Es kommt zur Vergrößerung der Vakuolen und zu Läsionen in den Membranen, welche meist das Absterben der Zellen zur Folge haben. Die Wirksamkeit der Substanzen ist selbst dann noch gegeben, wenn die Parasiten schon in die Darmzellen des Wirtes eingedrungen sind. Die Wirtszellen sind im Allgemeinen nicht von der Wirkung betroffen. Lasalocid ist im Gegensatz zu den übrigen Ionophoren in der Lage, auch divalente Ionen zu komplexieren und durch biologische Membranen zu schleusen [16].

Die Kenntnis der toxikologischen Daten der Kokzidiostatika ist Voraussetzung für deren Zulassung. Der Hersteller oder die Firma, welche für das Inverkehrbringen der Substanzen verantwortlich ist, müssen für die Ermittlung dieser Daten sorgen. Sie werden dann dem Zulassungsantrag in Form eines Dossiers beigelegt. In Langzeittierversuchen wird die Dosis-Wirkungs-Beziehung untersucht und z. B. als höchste Dosis ohne Wirkung (NOEL = no observed effect level) ausgedrückt. Aus dem NOEL wird die erlaubte Tagesdosis (acceptable daily intake – ADI) für den Menschen abgeleitet. Dabei werden durch einen Sicherheitsfaktor die unterschiedliche Empfindlichkeit von Tier und Mensch sowie individuelle Unterschiede berücksichtigt. Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) beurteilt die Repräsentativität der toxikologischen Studien und schlägt auf deren Grundlage Grenzwerte wie den ADI für den Wirkstoff vor. Für den Großteil der Kokzidiostatika konnte die EFSA erst nach dem Jahr 2000 vollständige Bewertungen abgeben. Die ADI- und NOEL-Werte sind in Tabelle 1 gegenübergestellt.

Pressman und Fahim [29] beschrieben, welche toxischen Wirkungen ionophore Substanzen beim Menschen als Folge des Einsatzes als Futtermittelzusatzstoffe auslösen können. Akute Vergiftungen, zum Beispiel mit Monensin, wurden bei Arbeitern in der Monensin-

**Tabelle 1:** Toxikologische Grenzwerte für Kokzidiostatika

Wirkstoff	ADI [ $\mu\text{g}/\text{kg KG}/\text{Tag}$ ]	NOEL [ $\text{mg}/\text{kg KG}/\text{Tag}$ ]
Lasalocid-Natrium [17]	5	0,5
Narasin [18]	5	0,5
Salinomycin-Natrium [19]	5	0,5
Monensin-Natrium [20]	3	0,3 (NOAEL)
Semduramicin [21]	1,25	0,125 (NOAEL)
Maduramicin [22]	1	0,16
Robenidin [23]	37,5	7,5 (NOAEL)
Decoquinat [24]	75	15
Halofuginon[25,26]	0,3	0,03 (NOAEL)
Nicarbazin [27]	770	200
Diclazuril [28]	1700	2,9

Herstellung bzw. Mischung von Monensin-haltigem Futter beobachtet. Kopfschmerzen, Schwindelgefühl, Übelkeit, Nasenbluten und Hautausschlag sind übliche Symptome. Die regelmäßige Aufnahme niedriger Dosen von Carboxylsäureionophoren bewirkt eine Erhöhung des Blutflusses im Herzen durch die spezifische Erweiterung der Herzkranzgefäße. Diese Wirkung kann sich mit der körpereigenen autoregulativen Weitung teilweise verstopfter Gefäße überlagern und zur Ableitung des Blutes aus mangelndurchbluteten Regionen des Herzens führen. Die Erscheinung wird als „coronary steal“ bezeichnet. Angesichts der weiten Verbreitung von Herzerkrankungen ist eine große Anzahl von Menschen von der möglichen zusätzlichen Schädigung des Herzmuskels durch die permanente Aufnahme von Carboxylsäureionophoren betroffen. Die Überwachung der Einhaltung von Höchstgehalten der Kokzidiostatika in Futtermitteln und Lebensmitteln ist deshalb eine wichtige Aufgabe. [11,29]

Neben den toxikologischen Risiken bergen Kokzidiostatika die Gefahr der Resistenzbildung in Mikroorganismen. Durch den Einsatz im Rotationsprinzip versucht man, dem Problem vorzubeugen. Es hat sich gezeigt, dass gegen chemische Kokzidiostatika schneller Resistenzen gebildet werden. Chapman berichtet von teilweiser Resistenz von *E. acervulina* und *E. tenella* gegen Diclazuril nach zehn Generationen der Erreger [16]. Die Selektion resistenter Mutanten bei Anwesenheit des Wirkstoffs erfolgt sofort, da das asexuelle Stadium der *Eimeria*-Arten haploid ist, also einen einfachen Chromosomensatz besitzt. Durch die starke Vermehrung der Parasiten im Darm des Wirtstieres kann der resistente Typ eines Erregers sehr schnell zum vorherrschenden werden. Die Mechanismen der Resistenzbildung sind bisher nur wenig aufgeklärt.

Kreuzresistenzen werden vorrangig gegen Wirkstoffe mit dem gleichen oder ähnlichen Wirkmechanismus entwickelt. In einer Studie [30] zur Wirkung von Salinomycin, Narasin und Lasalocid auf Monensin-resistente *E. tenella* wurden Kreuzresistenzen gegen Salinomycin und Narasin nachgewiesen. Die Wirkung von Lasalocid gegen die Vermehrung des Parasiten war ebenfalls gemindert. Sie ging jedoch nicht vollständig verloren, da

Lasalocid sich strukturell von den anderen Ionophoren unterscheidet und auch divalente Ionen komplexieren kann. Trotzdem ist eine leichte Kreuzresistenz wahrscheinlich. Ist ein Parasit resistent gegen mehrere Wirkstoffe mit unterschiedlichen Wirkungsweisen, spricht man von Multiresistenz. Diese kann durch den Einsatz der Substanzen in immer gleicher Reihenfolge bei aufeinanderfolgenden Hühnerherden entstehen. Chapman [16] untersuchte 15 in Hühnerfarmen isolierte *E. tenella* Kulturen auf Resistenzen gegen acht Kokzidiostatika. Fünf dieser Kulturen waren teilweise oder vollständig resistent gegen vier Wirkstoffe, zwei Kulturen sogar gegen fünf Wirkstoffe. Neben dem sequentiellen Einsatz der Kokzidiostatika könnte auch die genetische Rekombination zweier resistenter Stämme Ursache für die Ausbildung von Multiresistenzen sein. Studien konnten dies aber noch nicht eindeutig beweisen.

Resistenzen gegen bestimmte Wirkstoffe können unter Umständen nur temporär sein. Es ist denkbar, dass bei Vermeidung des Einsatzes eines Kokzidiostatikums über einen längeren Zeitraum die resistenten Stämme eines Mikroorganismus aussterben. In Laborstudien [31] wurde außerdem beobachtet, dass die Resistenz gegen eine Substanz durch den Einsatz eines bestimmten anderen Wirkstoffes verloren gehen kann. Die wirksamste Maßnahme zur Vorbeugung von Resistenzen ist jedoch der wechselnde Einsatz verschiedener Wirkstoffe, bestenfalls in Kombination mit Impfungen gegen bestimmte Erreger. Bis zur vollständigen Wirksamkeit des Impfschutzes sollen Kokzidiostatika gegen die Infektion mit Kokzidien vorbeugen. [16,32]

### 2.1.3 Kreuzkontamination von Futtermitteln

Mischfuttermittel bestehen aus speziell auf den Einsatzzweck abgestimmtem Grundfuttermittel und verschiedenen Futtermittelzusatzstoffen. In den Mischanlagen werden jeweils Futtermittel für verschiedene Anwendungen hergestellt. Deshalb können Futtermittelzusatzstoffe eine Anlage durchlaufen, in der auch Futtermittel für Nicht-Zieltierarten des Zusatzstoffes produziert werden. Aufgrund des komplexen Aufbaus der Mischanlagen verbleiben Reste einer Futtermittelcharge in der Produktionsanlage, wo sie mit den folgenden Futtermittelpartien in Berührung kommen. Diese können dadurch mit Futtermittelzusatzstoffen kontaminiert werden, die nicht für die Tierart zugelassen sind, für welche das Futtermittel vorgesehen ist. Bei der Herstellung von Mischfuttermitteln innerhalb einer Anlage sind diese Verschleppungen von Substanzen in Futtermittel für Nichtzieltierarten technisch unvermeidbar [33].

### Rechtliche Regelungen

Sind Kokzidiostatika in Futtermitteln für Tierarten vorhanden, die nicht als Zieltierart festgelegt sind, gelten sie als unerwünschte Stoffe gemäß der Richtlinie 2002/32/EG [34]. Höchstgehalte unerwünschter Stoffe sind im Anhang I festgesetzt. Die Erweiterung um Höchstgehalte für Kokzidiostatika, die aufgrund unvermeidbarer Verschleppungen in Futtermitteln für Nichtzieltierarten vorhanden sind, erfolgte mit der Richtlinie 2009/8/EG [7]. Trotz der Einhaltung dieser Höchstgehalte in Futtermitteln kann es zu Rückständen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs kommen. In der Verordnungen VO

(EWG) 2377/90 sind Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs festlegt [35]. Da nicht alle als Futtermittelzusatzstoffe zugelassenen Kokzidiostatika auch als Tierarzneimittel gelten, wurde 2009 auf Grundlage der VO (EWG) Nr. 315/93 zur Festlegung gemeinschaftlicher Verfahren zur Kontrolle von Kontaminanten in Lebensmitteln [36] eine Verordnung für Kokzidiostatika, die nur als Futtermittelzusatzstoffe zugelassen sind, erlassen. Mit dieser VO (EG) Nr. 124/2009 wurden Höchstgehalte an Kokzidiostatika in Lebensmitteln tierischen Ursprungs aufgrund unvermeidbarer Verschleppung in Futtermittel für Nichtzieltierarten festgelegt [8].

**Tabelle 2:** Höchstgehalte für Kokzidiostatika in Futtermitteln für Nicht-Zieltierarten und in Lebensmitteln

Kokzidiostatikum	RL 2009/8/EG [7] Höchstgehalt in Futtermitteln (mg/kg bez. auf 88 % TM)	VO (EG) Nr. 124/2009 [8] Höchstgehalt in Lebensmitteln (µg/kg Nassgewicht)
Lasalocid-Natrium	1,25	5
Narasin	0,7	2
Salinomycin-Natrium	0,7	3
Monensin-Natrium	1,25	2
Semduramicin	0,25 (als Natrium-Salz)	2
Maduramicin	0,05 (als Ammonium-Alpha)	2
Robenidin	0,7 (als Hydrochlorid)	25
Decoquinat	0,4	20
Halofuginon	0,03 (als Hydrobromid)	6
Nicarbazin	0,5	100
Diclazuril	0,01	2

### Ursachen und Gegenmaßnahmen

Kennedy et al. untersuchten mehrfach die Kreuzkontamination von Futtermitteln mit ionophoren Kokzidiostatika. In der Futtermittelmühle wurden nach der Mischung von Futter mit der zugelassenen Zusatzstoffkonzentration an Monensin [37] bzw. Lasalocid [38], Proben aus den neun folgenden Futtermittelchargen, welche keinen Wirkstoff enthalten sollten, entnommen. In der neunten Charge war noch immer Lasalocid (Nachweisgrenze: 50 µg/kg) nachweisbar, Monensin (Nachweisgrenze: 0,2 mg/kg) bis zur achten Charge. Eine weitere Untersuchung der Verschleppung von Lasalocid erfolgte mit einer granulierten Form des Wirkstoffes. Hier wurden nach der vierten Charge keine Lasalocid-Rückstände mehr nachgewiesen [37].

In einer weiteren Studie der Arbeitsgruppe [6] wurden Futtermittel einer Mühle untersucht, welche unter anderem Monensin-haltiges Futter produziert. Es wurde gezeigt, dass der überwiegende Teil des Masthühnerfutters, welches kein Monensin enthalten sollte, mit Monensin kontaminiert war. In 22 der 40 untersuchten Futtermittel wurden

Monensin-Gehalte über 1 %, viermal davon über 10 % der therapeutischen Dosis von 110 mg/kg nachgewiesen. Die Probenahme erfolgte an zwei verschiedenen Punkten der Produktionslinie, vor und nach der Pelletierung. Die größere Kontaminationsquelle war nachweislich die Pelletieranlage, woraufhin der Verlauf der Produktionslinie verändert wurde. Durch die Optimierung der Anlage konnte die verschleppte Menge Monensin zwar insgesamt deutlich reduziert werden, eine Grundkontamination der Futtermittel blieb trotzdem erhalten.

Die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit beurteilte potenzielle Gesundheitsrisiken von Kokzidiostatika durch Verschleppungen für Nichtzieltierarten sowie mögliche Rückstände in Lebensmitteln, die aus diesen Nichtzieltierarten hergestellt werden. Auf dieser Grundlage wurden 2007 und 2008 Grenzen für die Verschleppung der zugelassenen Kokzidiostatika in Futtermittel für Nichtzieltierarten vorgeschlagen. Die Kreuzkontamination sollte 10 % der zugelassenen Höchstkonzentration für Zieltierarten nicht überschreiten. Unter diesem Gehalt sei nicht von einer gesundheitlichen Beeinträchtigung von Nichtzieltierarten auszugehen. [33] In der Richtlinie 2009/8/EG wurden die Höchstgehalte mit einem Sicherheitsfaktor von 10 auf 1 % festgesetzt. Gleichzeitig wurden zum Schutz des Verbrauchers in Verordnung (EG) Nr. 124/2009 Höchstgehalte für die aus den Verschleppungen resultierenden Kokzidiostatika-Kontaminationen in Lebensmitteln festgelegt. Dazu wurden die Gutachten der EFSA herangezogen und die unterschiedlichen Vorgehensweisen der Mitgliedstaaten hinsichtlich der unvermeidbaren Verschleppungen beachtet. Die in den beiden Verordnungen verankerten Vorschriften waren vorläufig. Sie sollten bis zum Juli 2011 zu überprüft werden, damit dem aktuellen wissenschaftlichen Forschungsstand Rechnung getragen wird. Für die endgültige Festlegung der Höchstgehalte im Ei sind ausführliche Informationen über den Transfer aus dem Futtermittel in das Hühnerei erforderlich. Bisher liegen nur für einige Kokzidiostatika kinetische Studien und Daten zum Vorkommen im Ei vor.

### 2.1.4 Vorkommen von Kokzidiostatika in Hühnereiern

Während die Wirkstoffe in den Geweben des Huhns innerhalb weniger Tage abgebaut und ausgeschieden werden, können sie im Ei durch den langen Ovulationszyklus noch nach Wochen enthalten sein. Daten zum Vorkommen von Kokzidiostatika-Rückständen in Eiern werden in Deutschland unter anderem im Rahmen des Nationalen Rückstandskontrollplans (NRKP) erfasst. Seit 1989 werden in diesem Programm Lebensmittel tierischen Ursprungs auf Rückstände unerwünschter Stoffe untersucht, positive Proben bewertet und die Ergebnisse als Bericht veröffentlicht. Inzwischen werden jährlich 200 bis 300 Eierproben auf Kokzidiostatika untersucht und regelmäßig Rückstände nachgewiesen. In den letzten Jahren traten hier besonders Rückstände von Lasalocid und Nicarbazin auf. Im NRKP werden jedoch keine statistisch repräsentativen Daten erhoben, da die Probenahme zielorientiert, nach Region und nach Hinweisen auf unzulässige Tierbehandlung, erfolgt [40].

Kennedy et al. berichteten über Kokzidiostatika-Rückstände in Eiern in Nordirland und diskutierten die möglichen Ursachen. Eier von 161 bzw. 220 nordirischen Ei-Produzenten wurden 1994 und 1995 untersucht. In der ersten Studie [38] waren 107 von



161 Eier mit 0,3 µg/kg bis zu 129 µg/kg Lasalocid belastet. Wenige der untersuchten Proben enthielten Monensin, Salinomycin und Narasin. In diesem Zusammenhang wurde auch die Verschleppung von Lasalocid in Kokzidiostatika-freies Futtermittel nachgewiesen (siehe Kapitel 2.1.3) und daraufhin der pulverförmige Lasalocid-Premix durch eine granulierten Form ersetzt. Sechs Monate nach der Einführung des granulierten Präparates wurde die zweite Studie [41] durchgeführt. Der Anteil Lasalocid-belasteter Eiprobe war von 67,5 % auf 20,5 % gesunken. Trotzdem enthielten weiterhin 11 % der untersuchten Eier über 10 µg/kg Lasalocid.

### **2.1.5 Analytik von Kokzidiostatika in Futtermittel und im Ei**

Seit den 60er Jahren wurden vielfältige Methoden zum Nachweis von Kokzidiostatika in verschiedenen Matrices entwickelt. Nachdem anfangs die Dünnschichtchromatographie verwendet wurde, entwickelte man später gaschromatographische und flüssigchromatographische Methoden. Heute sind LC-MS/MS-Methoden die am weitesten verbreiteten Verfahren [42].

#### **Nachweismethoden**

##### **Gaschromatographie**

Weiss et al. entwickelten Pyrolyse-GC/MS-Methoden für die ionophoren Kokzidiostatika [42,43]. Die Analyten wurden in Silanol-Derivate überführt, pyrolysiert und nach chemischer Ionisation massenspektrometrisch detektiert. Der Nachweis von 51 µg/kg Lasalocid in Lebergewebe war mit dieser Methode möglich, Validierungsdaten wurden nicht veröffentlicht. Eine weitere GC-MS-Methode zum Nachweis von Monensin nach Silylierung publizierten Takatsuki et al. [44]. Diese war jedoch mit einer geschätzten Nachweisgrenze von 5 mg/kg Monensin in Muskelgewebe sehr unempfindlich. Monensin und die Ionophore im Allgemeinen, sind aufgrund ihrer hohen Molekülmasse und der geringen Flüchtigkeit nur bedingt für die Analyse mittels GC-MS geeignet [45].

##### **Hochleistungsflüssigkeitschromatographie**

Der Nachweis mittels UV- oder Fluoreszenzdetektor setzt eine entsprechende Aktivität der Analyten voraus. Für die UV-aktiven chemischen Kokzidiostatika wie Robenidin [46,47], Nicarbazin [48–50] und Diclazuril [51] wurden HPLC-UV-Methoden mit Umkehrphasen beschrieben. Normalphasen-HPLC-Methoden mit Fluoreszenzdetektion wurden für das Ionophor Lasalocid in Futtermittel [52] sowie in Leber [53] entwickelt. Alle anderen Ionophore weisen weder UV- noch Fluoreszenz-Aktivität auf. Durch Derivatisierung mit verschiedenen Derivatisierungsreagenzien können die Analyten dennoch nach Anregung mit UV [54] und Fluoreszenz detektiert [55,56] werden. Als Reagenzien zur Vorsäulenderivatisierung wurden 9 Anthryldiazomethan [44,57,58], 1 Bromacetylpyren [59] und Pyridiniumdichromat [60] verwendet. Die Methoden waren jedoch mit Bestimmungsgrenzen von 50 µg/kg bis 500 µg/kg sehr unempfindlich. Vanillin [61–66] und Dimethylaminobenzaldehyd [60] dienten zur Nachsäulenderivatisierung. Die Bestimmungsgrenzen betrugen 3 µg/kg bis maximal 100 µg/kg. Im Vergleich zu den Vorsäulenderivatisierungsmethoden wurden damit höhere Wiederfindungsraten erzielt.

### Immunoassays

Immunologische Methoden sind besonders für Screening geeignet. Huet et al. veröffentlichten eine Methode mit einem kompetitiven ELISA zum Nachweis von Halofuginon und Nicarbazin in Ei und Hühnermuskel [67]. Des Weiteren entwickelten Peippo et al. eine Fluoroimmunoassay-Methode zum Screening nach Narasin in Plasma [68] und für Monensin in Eiern [69]. Lasalocid und Semduramicin [70], Salinomycin [62] und Halofuginon [71] wurden auf der Basis monoklonaler Antikörper mittels Immunoassay zum Beispiel in Lebergewebe von Geflügel nachgewiesen. Aufgrund der hohen Spezifität der immunologischen Methoden wurden sehr niedrige Nachweisgrenzen zwischen 10 ng/kg und 3 µg/kg Kokzidiostatikum in verschiedenen tierischen Matrices erzielt. Die Methoden wurden jedoch kaum auf die Kreuzreaktivität gegenüber anderen Kokzidiostatika bzw. deren Metaboliten getestet und bergen daher das Potenzial eines hohen Anteils falsch-positiver Analysenergebnisse [45]. Für jedes Kokzidiostatikum bzw. die strukturverwandte Gruppe der Kokzidiostatika muss ein spezifischer Antikörper vorhanden sein. Deshalb ist die Entwicklung einer Multi-Methode zum immunologischen Nachweis aller als Futtermittelzusatzstoffe zugelassenen Kokzidiostatika nicht möglich.

### Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie

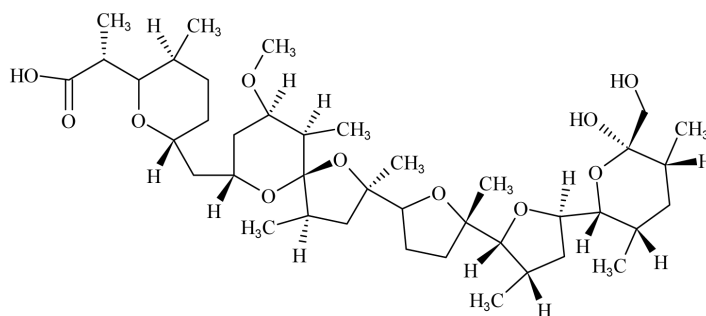
Mit der Kopplung von HPLC mit der Massenspektrometrie wurde die Voraussetzung zur Entwicklung von Multi-Methoden zum Nachweis und zur Quantifizierung der Kokzidiostatika geschaffen. Die Messtechnik hat sich seitdem zur Methode der Wahl entwickelt. Es wurden Methoden mit verschiedenen Ionisationstechniken publiziert. Dazu gehörten die Thermospray-Ionisation (TSI) und die Desorption Chemical Ionization (DCI), die z. B. zum Nachweis von Lasalocid in Geflügelleber [72] und Maduramicin in Fettgewebe eingesetzt wurden [73]. Des Weiteren wurde Monensin in Fettgewebe mit der Fast Atom Bombardement (FAB) Technik analysiert [74]. Nachteile dieser Methoden waren die zum Teil geringe Empfindlichkeit und Selektivität.

Die Leistungsfähigkeit der Methoden wurde mit der Entwicklung der Elektrospray Ionisation (ESI) und der Tandem-Massenspektrometrie erhöht. Schneider et al. publizierten die erste LC-ESI-MS/MS-Methode für ionophore Kokzidiostatika. Die Übergänge von den Natrium-Addukten der Moleküle Semduramicin [75], Lasalocid [76], Monensin, Salinomycin und Narasin [77] auf jeweils zwei spezifische Fragmentionen wurden mit dieser Technik gemessen. Aufgrund der hohen Selektivität konnten niedrigere Nachweisgrenzen um 1 µg/kg erzielt werden. Die Verwendung von Ammonium-Addukten anstelle von Natrium-Addukten als Vorläufer-Ionen für die ionophoren Kokzidiostatika wird selten beschrieben.

Auch für die chemischen Kokzidiostatika wurden LC-MS/MS-Methoden entwickelt. Eine der ersten Methoden zum Nachweis von Nicarbazin in Hühner-Leber und Ei veröffentlichten Yakkundi et al. [58]. Dabei wurde Nicarbazin, das einen äquimolaren Komplex aus 4,4'-Dinitrocarbanilid (DNC) und 4,6-Dimethyl-2-Pyrimidinol darstellt, als deprotoniertes DNC [M-H]<sup>-</sup> detektiert. Seit 2002 wurden zunehmend Methoden veröffentlicht, mit denen ionophore und chemische Kokzidiostatika gemeinsam analysiert werden können. Zunächst konnte nur jeweils ein Ionisationsmodus verwendet, das heißt nur positiv oder negativ ionisiert werden. Matabudul et al. [47] analysierten Nicarbazin als proto-

niertes DNC gemeinsam mit Lasalocid, Monensin, Salinomycin und Narasin. Eine Multimethode mit Wechsel des Ionisationsmodus wurde erstmals 2004 von Dubois et al. für Ei beschrieben [78]. Seitdem wurden mehrere Methoden für den Nachweis der Mehrheit oder aller derzeit als Futtermittelzusatzstoffe zugelassenen Kokzidiostatika entwickelt. Sie wurden für die Matrices Leber [79], Oberflächenwasser [80], Muskel und Ei [81] und Futtermittel [82] etabliert. Letztere Methode wurde speziell für die Kontrolle der in Richtlinie 2009/8/EG festgelegten Höchstgehalte entwickelt. Mit diesen Multimethoden wurden Nachweisgrenzen im unteren  $\mu\text{g/kg}$ -Bereich in Futtermittel und z.T. unter  $1 \mu\text{g/kg}$  in tierischen Matrices erreicht.

Die chromatographische Trennung mehrerer Kokzidiostatika erfolgt in der Regel auf Umkehrphasen wie auf kieselgelbasierten C18-Trennsäulen. Als Fließmittel dienen Gemische aus Acetonitril, z. T. Methanol [81] und Wasser mit Zusätzen wie Ameisensäure, Essigsäure, Ammoniumformiat [79] oder -acetat zur Erhöhung der Ionisationsausbeute. Für die Methoden mit LC-MS/MS-Detektion werden häufig interne Standardsubstanzen zum Ausgleich von Verlusten während der Probenaufarbeitung und von Schwankungen der LC-MS/MS-Messung verwendet. Für die chemischen Kokzidiostatika werden hauptsächlich stabilisotopenmarkierte Formen der Analyten verwendet [78,83].



**Abbildung 3:** Struktur des internen Standards Nigericin

Das Polyetherionophor Nigericin (Struktur siehe Abbildung 3) wird häufig als interner Standard für die ionophoren Kokzidiostatika eingesetzt, da keine stabilisotopenmarkierten Varianten der Ionophore zur Verfügung stehen. [82,84]

## Probenaufarbeitung

### Extraktionsmethoden

Die Extraktion der Kokzidiostatika aus Futtermittelproben erfolgt meist mit Methanol [54,85] oder Methanol-Wasser 9+1 durch einfache Fest-Flüssig-Extraktion (solid-liquid-extraction – SLE) wie Schütteln [52,54,85], Mixen [55], Rühren [33] oder mit Ultraschall [81]. Als Extraktionsmittel werden außerdem Acetonitril [55] und andere Lösungsmittelgemische wie Hexan-Ethylacetat 9+1 [86] oder Ethylacetat mit Natriumacetat-Puffer [68] verwendet. Seltener kommen Methoden wie die beschleunigte Lösungsmittel-extraktion (accelerated solvent extraction – ASE) [46] oder Extraktion mit superkritischem Kohlendioxid (supercritical fluid extraction – SFE) [48] zum Einsatz.

Bei der Analyse von Eiprobe wird zunächst eine Proteinfällung mit Acetonitril durchgeführt [87,88], welches gleichzeitig zur Extraktion der Analyten aus der Matrix dient. Manche Methoden beinhalten eine Trocknung des Probenmaterials vor der Extraktion, zum Beispiel mit Natriumsulfat [78,88,89].

### **Clean-up**

Bei einem Großteil der LC-MS/MS-Methoden wird auf eine Reinigung der Probenextrakte vor der Analyse verzichtet. Üblicherweise wird der Extrakt eingedampft, in einem für die Messung geeigneten Lösungsmittel aufgenommen und filtriert [84]. In einigen Methoden werden Probenaufreinigungsverfahren mittels Festphasenextraktion (solid phase extraction – SPE) unter Umkehrphasenbedingungen auf C18-Material beschrieben. Es gibt einige Analysenvorschriften, in welchen Kieselgel-Kartuschen zur Reinigung im Normalphasen-Modus eingesetzt werden [78,86,88,89]. Tarbin et al. entwickelten eine on-line clean-up Methode für den Nachweis von Nicarbazin in Eiern, bei welcher die Probe durch ein Säulenschaltssystem erst über eine Vorsäule und anschließend auf die analytische Säule transportiert wird [49], [79]. Zur Entfettung der Proben wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) mit Hexan beschrieben, die jedoch nicht zu zufriedenstellenden Ergebnissen führte [87].

### **Offizielle Methoden für die amtliche Überwachung**

In der Europäischen Union sind die Anforderungen an Methoden, die zur amtlichen Kontrolle von Lebensmitteln und Futtermitteln in der Verordnung (EG) 882/2004 geregelt. Diese Anforderungen gelten auch für die Kontrolle von Kokzidiostatika, die durch unvermeidbare Verschleppungen in Futtermitteln und Lebensmitteln vorhanden sind. Kapitel III, und Artikel 11 im Speziellen, behandeln Probenahme und Analysenverfahren. Die Anerkennung der Untersuchungsmethoden für Futtermittel folgt einer Hierarchie, der sogenannten Methodenkaskade. Für Entscheidungen im Streitfall sind zuerst immer die in EU-Richtlinien vorgeschriebenen Referenz-Methoden anzuwenden. Sollten solche nicht zur Verfügung stehen, so können international oder national standardisierte Methoden (CEN, DIN) zur Anwendung kommen. Diesen Vorschriften untergeordnet sind Methoden aus Sammlungen von Interessenverbänden, z. B. dem Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA Laborinterne nach international anerkannten Protokollen, zum Beispiel nach IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) validierte Methoden sind dann rechtswirksam, wenn keine übergeordneten Vorschriften vorhanden sind.

Im Bereich der Lebensmittelkontrolle sind EU-Referenzmethoden im Streitfall zwischen EU-Mitgliedsstaaten anzuwenden. Innerhalb Deutschlands liefern Methoden aus der amtlichen Methodensammlung nach § 64 des Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuches (LFGB) gerichtsfeste Ergebnisse. Grundsätzlich können auch nach anerkannten Protokollen validierte Methoden angewendet werden, solange keine gegensätzlichen Ergebnisse für eine Probe vorliegen. Laut Anhang III Absatz 3 der Verordnung (EG) 882/2004 sind Multianalytmethoden gegenüber Einzelmethoden zu bevorzugen [2].

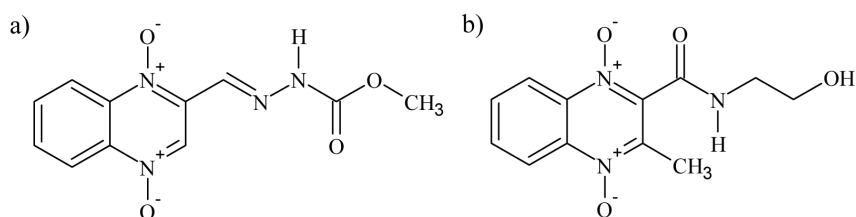
Die beschriebenen Methoden zur Bestimmung von Kokzidiostatika in Futtermitteln

und tierischen Matrices mittels LC-MS/MS weisen im Allgemeinen eine ausreichende Empfindlichkeit für die Anwendung in der amtlichen Kontrolle von Lebens- und Futtermitteln auf. Die Erfahrungen aus der Praxis besagen jedoch, dass matrixbedingt häufig Probleme bezüglich der Robustheit der Analysenergebnisse auftreten [90]. Die Aufreinigung der Probenextrakte, z.B. mittels Festphasenextraktion kann die Robustheit verbessern, erhöht jedoch auch den zeitlichen und finanziellen Aufwand der Methode, welcher in der Praxis möglichst gering zu halten ist. Mit zunehmender Leistungsfähigkeit der LC-MS/MS-Geräte kann die Robustheit der Methoden auch durch Verdünnung der Matrix verbessert werden.

## 2.2 Carbadox und Olaquinox

### 2.2.1 Bedeutung und Eigenschaften von Carbadox und Olaquinox

Carbadox (CBX) und Olaquinox (OQX) gehören zur Gruppe der Quinoxalin-1,4-dioxide (Struktur siehe Abbildung 4), die vor allem in der Schweineaufzucht als antimikrobielle Wachstumsförderer (zootechnische Futtermittelzusatzstoffe) eingesetzt wurden [91,92]. Des Weiteren dienten sie zur Prävention von Schweinediarrhoe und bakterieller Enteritis (CBX) [93] und zur Behandlung von Diarrhoe bei Absatzferkeln (OQX) [94].



**Abbildung 4:** Strukturformeln von a) Carbadox und b) Olaquinox

Seit 1998 ist der Einsatz von CBX und OQX als Futtermittelzusatzstoffe zur Wachstumsförderung in der Europäischen Union verboten [95]. Gründe dafür sind das mutagene, karzinogene und fotoallergene Potenzial der Substanzen [96,97], sowie die Gefahr der Bildung von resistenten Bakterienstämmen [91]. Das Verbot der Substanzen hatte eine Nulltoleranz der Substanzen in Futtermitteln und Lebensmitteln zur Folge. Für die amtliche Kontrolle von Futtermitteln sind deshalb spezifische Methoden zur Bestimmung von CBX und OQX in Futtermitteln mit Nachweis- und Bestimmungsgrenzen im unteren ppb-Bereich erforderlich.

### 2.2.2 Analytik von Carbadox und Olaquinox in Futtermitteln

Zur Extraktion von CBX und OQX aus Futtermitteln sind in der Literatur Methoden der Fest-Flüssig-Extraktion durch Schütteln [98–100] oder mit Ultraschall [101] unter Verwendung organischer Lösungsmittel, z. T. im Gemisch mit Wasser, beschrieben. Als Extraktionslösungsmittel dienen Mischungen aus Acetonitril, Methanol und Wasser [102] bzw. Methanol und Wasser [98,103]. Zur Extraktion aus tierischem Gewebe werden auch reines Acetonitril [104, 105] oder Acetonitril und Methanol [106] verwendet. Die so erhaltenen Extrakte werden zum Teil in einem weiteren Schritt gereinigt. Verschiedene organische Lösungsmittel wie Hexan [104,105] oder iso-Octan [106,107] werden zur Flüssig-Flüssig-Extraktion verwendet, um Fettbestandteile aus den Extrakten zu entfernen. In anderen Methoden werden die Extrakte mittels Festphasenextraktion, z.B. mit Aluminiumoxid-Kartuschen [103] oder Umkehrphasen-Kartuschen auf Polymerbasis wie Oasis ® HLB [100], [102,108], gereinigt.

Die anschließende Detektion von CBX und OQX erfolgt nach flüssigchromatographischer Trennung mittels UV-Detektor [98,102,103], mittels Massenspektrometrie [105] oder Tandem-Massenspektrometrie [99,100,108,109]. Für die chromatographische Trennung der Analyten vor der Detektion werden Trennsäulen mit Umkehrphasen, hauptsächlich mit C8- [98], [104] und C18-Materialien [99,100,102,105], verwendet. Die LC-MS/MS-Methoden sind derzeit als leistungsfähigste Methoden zur Analytik von CBX und OQX in Futtermitteln einzustufen. Sie ermöglichen die Identifikation und Quantifizierung der Substanzen in tierischen Matrices und in Futtermitteln im µg/kg-Konzentrationsbereich. Die Bestimmungsgrenzen von CBX und OQX im Futtermittel liegen mit 20 µg/kg [110] um Faktor 10 höher als die in tierischen Geweben. Dies unterstreicht den hohen Anspruch an Methoden für die Spurenanalytik in der komplexen Matrix Futtermittel. Auch wenn die Einhaltung des Einsatzverbotes der Substanzen mit den aktuell verfügbaren Methoden überwacht werden kann, besteht hier noch Optimierungspotenzial.

## 2.3 LC-MS/MS und Matrixeffekte

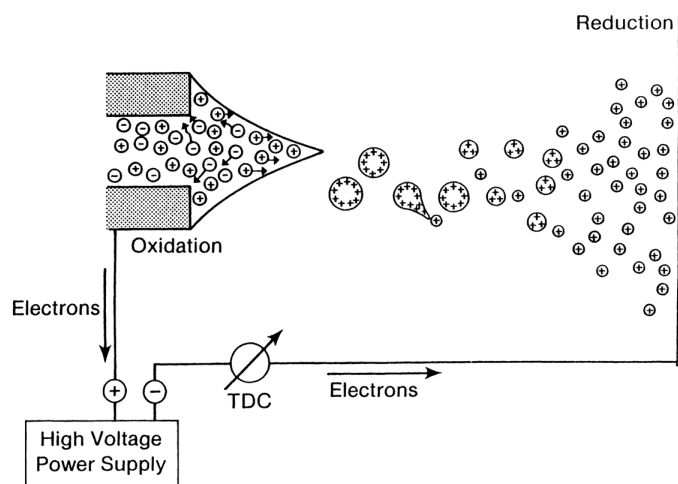
### 2.3.1 Theorie der LC-MS/MS-Technik

Für die vorliegende Arbeit stand ein System aus einem Hochleistungsflüssigkeitschromatographen und einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit linearer Ionenfalle zur Verfügung. Die Substanzen wurden nach flüssigchromatographischer Trennung mittels ESI ionisiert und im MRM-Modus die Übergänge vom jeweiligen Vorläuferion auf spezifische Fragmentationen gemessen. Jeweils ein Übergang wurde zur Quantifizierung ausgewählt, ein bis zwei weitere zur Identifizierung bzw. Bestätigung. Zusätzlich wurden Vergleichsmessungen an einem weiteren Triple-Quadrupol-MS-System durchgeführt. Die LC-MS/MS-Technik eignet sich besonders für die Analytik von wenig flüchtigen Substanzen. Nach der Trennung durch die Hochleistungsflüssigchromatographie wird die Probe unter Atmosphärendruck ionisiert. Dazu stehen die drei Ionisationstechniken Electrospray Ionization (ESI), Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) und Atmospheric Pressure Photoionization (APPI) zur Verfügung. Zur Analyse von Kokzidiostatika wird ausschließlich die Electrospray Ionisation verwendet. Die Methode ist im Vergleich zur APCI und APPI für eine größere Anzahl von Substanzen einsetzbar. Der Übergang neutraler Moleküle in Lösung zu geladenen Teilchen in der Gasphase erfolgt bei der Kopplung von Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie unter Atmosphärendruck. Bei der APCI werden die ungeladenen Teilchen in die Gasphase gebracht und erst dann durch chemische Reaktion ionisiert. Im Gegensatz dazu werden bei der Electrospray Ionisation die Lösungsmitteltropfen geladen, in denen die Analytmoleküle gelöst sind. Aus diesen Tröpfchen wird das Lösungsmittel verdampft, bis, vereinfacht gesehen, nur noch Analytionen zurückbleiben.

#### Electrospray Ionisation

Die Electrospray Ionisation überführt Moleküle aus einer Flüssigkeit in gasförmige Ionen. Dazu wird die flüssige Probe durch eine Edelmetallkapillare in die Ionisationsquelle geleitet. An der Kapillare wird je nach dem bevorzugt vom Analyten gebildeten Ion (Kation bzw. Anion) ein positives oder negatives Potenzial angelegt. Beim Austritt aus der Kapillare wirkt ein starkes elektrisches Feld auf die Flüssigkeit, in welcher üblicherweise Elektrolyte in dissoziierter Form vorliegen. Ionen mit der gleichen Ladung wie die Kapillarspitze entfernen sich von dieser, indem sie sich zur Flüssigkeitsoberfläche bewegen. Entgegengesetzt geladene Teilchen sammeln sich im Inneren der Flüssigkeit. Bei dem in Abbildung 5 dargestellten Beispiel, ist die Spraykapillare die positive Elektrode und die positiven Ionen an der Flüssigkeitsoberfläche werden zur negativ geladenen Gegenelektrode beschleunigt. Dadurch wird die Oberfläche instabil und bildet den sogenannten Taylor Konus. Aus diesem werden kleine positiv geladene Tröpfchen abgegeben, sobald die elektrostatische Abstoßung stärker wird als die Oberflächenspannung. Negativ geladene Teilchen bleiben im Flüssigkeitskonus zurück. [111,112]

Die Bildung des Aerosols wird durch ein Gas (Stickstoff) unterstützt, welches als Hülle um die äußere Wand der Spraykapillare in Richtung der Gegenelektrode strömt. Das Spraygas erleichtert nicht nur das Ablösen der geladenen Tröpfchen vom Taylor Konus,



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung des Electrospray-Prozesses [111]

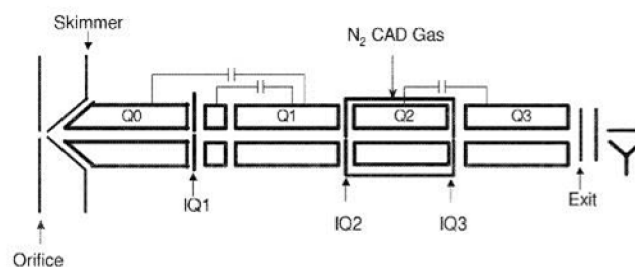
sondern unterstützt auch die Flugrichtung der Tröpfchen in Richtung Interface-Platte. Außerdem trägt es neben der Quelltemperatur zur Verdunstung des Lösungsmittels aus den Tröpfchen bei. Durch die Entfernung des Lösungsmittels schrumpfen die Tröpfchen und die Ladungsdichte an der Oberfläche nimmt zu. Verformungen des Tropfens durch die Beschleunigung zur Gegenelektrode verursachen punktuell übermäßige Abstoßungskräfte, die zum Zerfall in kleinere Tröpfchen, sogenannte offspring droplets, führen. Dieser Prozess wiederholt sich, bis zu einem bestimmten Tropfdurchmesser, ab welchem der Ladungsüberschuss des Tröpfchens durch die Entlassung einzelner Ionen reduziert wird. Diese Ionen können direkt in das Massenspektrometer überführt werden. Restliches Lösungsmittel in geladenen Tröpfchen kann vor dem Eintritt in das Massenspektrometer schließlich noch durch das senkrecht zur Flugrichtung der Tröpfchen strömende Curtain Gas (API 4000 QTrap) verdampft werden. Das zweite verwendete LC-MS/MS-System (TSQ Vantage) erreicht dies durch eine geheizte Transferkapillare in das Massenspektrometer.

### Tandem-Massenspektrometrie und Multi-Reaction-Monitoring (MRM)

Die erzeugten Ionen werden anschließend im Tandem-Massenspektrometer analysiert. Das Triple-Quadrupole-System dient zur Selektion der Ionen anhand ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses. Vor dem Triple-Quadrupol-System (Abbildung 6) befindet sich ein weiterer Quadrupol (Q0) zur Fokussierung der Ionen. Im Multi-Reaction-Monitoring Messmodus werden die Übergänge eines Vorläufer-Ions auf dessen spezifische Fragment-Ionen analysiert. Der Ionenstrom gelangt durch den Skimmer zunächst in den Q0 und wird dort fokussiert, bevor er in den Q1 gelangt. Im Q1 werden die Analyt-Ionen durch das Anlegen entsprechender Spannungen anhand ihres  $m/z$ -Verhältnisses selektiert um dann im Q2 fragmentiert zu werden. Dieser Quadrupol dient als Kollisionszelle und enthält dafür Stickstoff als Kollisionsgas.

Im letzten Quadrupol (Q3) werden dann die spezifischen Fragment-Ionen durch An-





**Abbildung 6:** Schematischer Aufbau des Triple-Quadrupol-Massenspektrometers mit linearer Ionenfalle [113]

legen entsprechender Spannungen herausgefiltert und im nachfolgenden Elektronenmultiplier detektiert.

### 2.3.2 Matrixeffekte in der LC-MS/MS – Definition, Ursachen und Auswirkungen

Die Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie ist eine anerkannte Analysetechnik für ein weites Spektrum an Analyten in verschiedensten Matrices. Sie findet vor allem Anwendung in der Spurenanalytik. Nach der Etablierung und Verbreitung von LC-MS/MS-Methoden, zum Beispiel in der Analytik von pharmazeutischen Wirkstoffen in biologischen Matrices, galt diese Technik zunächst als einzigartig robust bei sehr einfacher oder ohne Probenaufarbeitung [114–117]. Seit dem Ende der 90er Jahre wird jedoch verstärkt über die Grenzen der Technik berichtet. Trotz der hohen Spezifität und Empfindlichkeit der Tandem-Massenspektrometrie können verschiedene Faktoren, vor allem aber Bestandteile komplexer Matrices, die Qualität der Analyse negativ beeinflussen. Die Auswirkungen dieser Störfaktoren werden als Matrixeffekte bezeichnet. [118,119]

Matrixbestandteile, die zeitgleich mit den Analyten von der Trennsäule eluieren, können zur Erhöhung oder zur Unterdrückung des Analytsignals führen [120]. In der Ionenquelle wird bei Anwesenheit der Störkomponenten die Ionisationsrate der untersuchten Substanzen verändert. Tang und Kobarle [121], Eshragi und Chowdhury [122] beschrieben bereits 1993 die Unterdrückung der Ionisation von Molekülen im Elektrospray. Der Einfluss der Matrix auf die Ionisation eines Analyten ist von einer Vielzahl von Faktoren abhängig: besonders die Ionisationsart (positiver/negativer Modus) [123], das Prinzip der Ionisation (ESI, APCI) [124,125] und die Geometrie der Ionisationsquelle [126–128], aber auch die Art und Konzentration des für die Chromatographie verwendeten Puffers [129] sind dabei von Bedeutung.

Die Erklärung dieser Phänomene erfordert genaue Kenntnis des Ionisationsprozesses, der jedoch nicht vollständig aufgeklärt ist. Beim Übergang der ungeladenen Moleküle aus geladenen ESI-Tröpfchen zu geladenen Molekülionen in der Gasphase konkurrieren die Moleküle des Analyten und der Matrixkomponenten miteinander um die vorhandenen Ladungen [112]. Die Matrixkomponenten sind in der Regel im Überschuss vorhanden. Des Weiteren ist die Position eines Moleküls im geladenen Tröpfchen entscheidend für die Ionisation. Die Teilchen an der Tropfenoberfläche werden als Erste ionisiert und

aus dem Tropfen geschleust. Rein statistisch gesehen können die Analytmoleküle weniger Plätze an der Tropfenoberfläche belegen als die Probenbestandteile und werden deshalb später ionisiert. Dies kann durch die Anwesenheit oberflächenaktiver Substanzen noch verstärkt werden. [130] Diese verhindern die Positionierung anderer Moleküle an der Tropfenoberfläche und können die Verdampfung des Lösungsmittels aus dem Tropfen stark verlangsamen. Die Ionisationsausbeute des Analyten wird dadurch beeinträchtigt. Während die Ionensuppression größtenteils physikalisch aufgeklärt wurde, gibt es bisher kaum Informationen über die Mechanismen der Ionenverstärkung [131]. Die Matrixkomponenten können neben der Ionisation der Analyten auch deren chromatographische Trennung beeinflussen. Veränderte Wechselwirkungen zwischen stationärer Phase und Analyt beeinträchtigen Signalauflösung und -symmetrie, welche sich direkt auf die Empfindlichkeit und die Präzision der Messmethode auswirken [123].

Das Ausmaß der Matrixeffekte ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Dazu gehören die Art und Konzentration des Probenmaterials sowie die chemisch-physikalischen Eigenschaften der Störkomponenten und der Analyten [119]. Durch die Probenaufarbeitung sollen Matrix und Analyt möglichst vollständig voneinander getrennt werden. Dies ist umso schwieriger, je ähnlicher die Eigenschaften der Störsubstanzen und der Analytmoleküle sind. Die Folge dieser Effekte für die Analysenmethode sind geringe Präzision und Robustheit, schlechte Wiederfindungsraten sowie hohe Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.

Zur Reduktion des Matrixanteils in der Messlösung gibt es zwei Strategien. Der Extrakt wird entweder gereinigt, z. B. durch Flüssig-Flüssig-Extraktion oder Festphasenextraktion, oder er wird verdünnt („dilute and shoot“). Letzteres ist bei Analytkonzentrationen im  $\mu\text{g/kg}$ -Bereich oft nicht möglich, da die erforderlichen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen meist nur durch eine Anreicherung erzielt werden können. Besonders komplexe Probenmaterialien, wie biologische Matrices, erfordern eine Reinigung der Rohextrakte. Dabei ist zu beachten, dass zusätzliche Bearbeitungsschritte Quelle für exogene Störsubstanzen sein können. Diese, aus den Materialien zur Probenaufarbeitung stammenden Substanzen, können ebenfalls Matrixeffekte verursachen [123,126]. Die Ausprägung von Matrixeffekten und die Effizienz von Maßnahmen zur Entfernung von Störsubstanzen können mit Hilfe von Matrixeffektuntersuchungen abgeschätzt werden. Entsprechende Verfahren werden im Folgenden genauer erläutert.

### 2.3.3 Methoden zur Untersuchung von Matrixeffekten in der LC-MS/MS

Zur Untersuchung von Matrixeffekten wurden mehrere Methoden etabliert. Buhrman et al. entwickelten einen Versuchsansatz zur Ermittlung des Einflusses des Probenmaterials auf einen Analyten mit einer definierten Nachweismethode [118]. Dieser wurde später von Matuszewski et al. erweitert [132]. Dabei werden drei Parameter (Matrixeffekt, Wiederfindung, Prozesseffizienz) ermittelt, die für den Retentionsbereich des Analyten charakteristisch sind. Für die Berechnung dieser Kenngrößen werden drei Serien (Sets) von Standardreihen jeweils im Fünffachansatz hergestellt und analysiert. Set 1 besteht aus einer Konzentrationsreihe des Analyten in reinem Lösungsmittel, Set 2 und 3 sind im Probenextrakt gelöst. Der Unterschied zwischen den Standardreihen 2 und 3 besteht im

Zeitpunkt der Zugabe des Analyten. Dieser wird einmal nach der Extraktion einer Blindwertprobe zugesetzt (postextraction addition – Set 2) und vor der Extraktion auf eine Blindwertmatrix dotiert (preextraction addition – Set 3). Die Menge an extrahiertem Probenmaterial in den letzten beiden Sets ist identisch.

$$\text{Matrixeffekt ME (\%)} = \frac{\text{Signal postextraction addition}}{\text{Signal Standard in Lösungsmittel}} \cdot 100 \quad (1)$$

$$\text{Matrixeffekt ME}^*(\%) = \left( \frac{\text{Signal postextraction addition}}{\text{Signal Standard in Lösungsmittel}} - 1 \right) \cdot 100 \quad (2)$$

\*... Matrixeffekt als bipolare Größe

Der Matrixeffekt wird als Verhältnis des Analytsignals des nach der Extraktion dotierten Standards zum Signal des Standards in Lösungsmittel berechnet (Formel 1). Für ein anschaulicheres Ergebnis soll der Wert des Matrixeffektes „0 %“ betragen, wenn kein Matrixeffekt vorliegt. Deshalb erzeugt man durch Subtraktion von 100 % eine bipolare Größe und erhält so negative Matrixeffektwerte für Ionensuppression und positive Werte für Ionenverstärkung (Formel 2). Im weiteren Verlauf der Arbeit wird ausschließlich diese bipolare Form des Matrixeffektes berechnet, beurteilt und von dieser als Matrixeffekt gesprochen. Aus dem Quotienten der Signale vor der Extraktion dotierter Proben zu den nachher dotierten Proben ergibt sich die Extraktionseffizienz bzw. die Wiederfindung (Formel 3). Das Verhältnis des Signals aus Set 3 zum Analytsignal von Set 1 bildet die Prozesseffizienz der gesamten Methode (Formel 4).

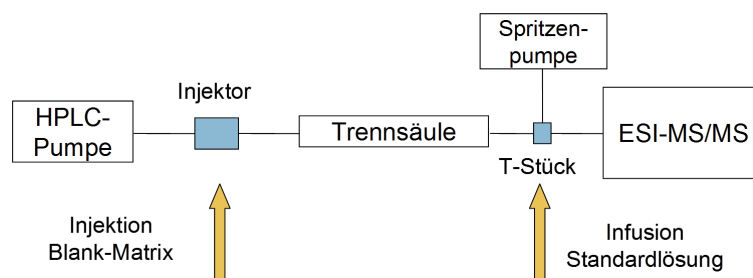
$$\text{Wiederfindung RE (\%)} = \frac{\text{Signal preextraction addition}}{\text{Signal postextraction addition}} \cdot 100 \quad (3)$$

$$\text{Prozesseffizienz PE (\%)} = \frac{\text{Signal preextraction addition}}{\text{Signal Standard in Lösungsmittel}} \cdot 100 \quad (4)$$

Dieser Ansatz ermöglicht die Unterscheidung von Signalveränderungen verursacht durch Extraktionsverluste gegenüber denen durch Ionensuppression bzw. -verstärkung entstandenen Veränderungen. Die beiden Ursachen können auch in ihrer Größenordnung abgeschätzt werden. Als vereinfachte Version der postextraction addition wurde in einigen Arbeiten auch die Fließinjektionsanalyse von Standardlösungen und dotierten Blankextraktion durchgeführt. Dadurch kann der Anteil der chromatographischen Trennsäule am Matrixeffekt ausgeblendet werden, was einen Vorteil darstellt, wenn lediglich Probenaufarbeitungsmethoden verglichen werden sollen. Zur realistischen und vollständigen Betrachtung des Matrixeffektes eine Analysenmethode sollte das HPLC-System jedoch mit einbezogen werden.

Eine andere Möglichkeit zur Analyse von Matrixeffekten ist die postcolumn infusion Technik (PCI). Bonfiglio et al. [119] stellten 1999 diese Methode zur Untersuchung des Einflusses der Probenaufarbeitung auf Veränderungen der Electrospray Ionisation vor. Sie leiteten mit einer Spritzenpumpe, über ein T-Stück, kontinuierlich eine Standardlösung des Analyten in den HPLC-Fluss nach der Trennsäule. So erzeugten sie ein

konstantes Analytsignal. Anschließend wurden unterschiedlich behandelte Blindwertmatrixextrakte injiziert. Abbildung 7 zeigt den schematischen Versuchsaufbau der PCI.



**Abbildung 7:** Schematischer Aufbau des postcolumn infusion (PCI) Systems

Die Veränderung des Signals des eingeleiteten Analyten im Vergleich zur Injektion von reinem Lösungsmittel beschreibt den Matrixeffekt der Probe. Entsprechend der Gleichung (1), welche auch Buhrman et al. [118] verwendeten, wird für jeden einzelnen Messpunkt aus dem Response der Matrixinjektion und der Lösungsmittelinjektion der Matrixeffekt berechnet (Formel 5). Auf diese Weise erhält man ein Matrixeffektprofil über den gesamten HPLC-Lauf.

$$\text{Matrixeffektprofil ME}^*(\%) = \left( \frac{\text{Signal bei Injektion der Blindwertmatrix}}{\text{Signal bei Injektion des Lösungsmittels}} - 1 \right) \cdot 100$$

\*... Matrixeffekt als bipolare Größe

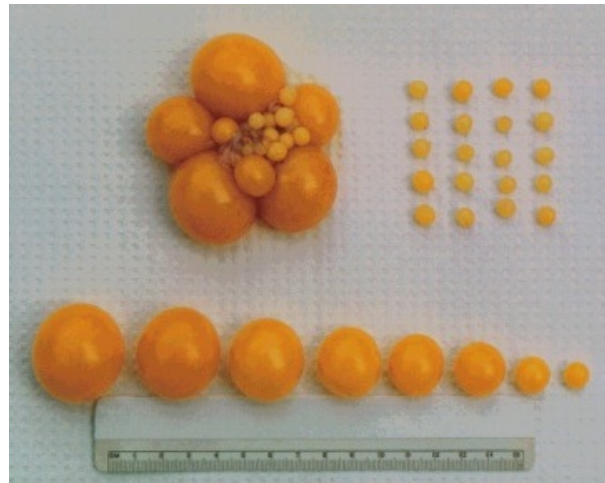
(5)

So kann für die Analyse einer bestimmten Substanz die Extraktions-, Aufreinigungs- und HPLC-Methode mit dem geringsten Matrixeinfluss ermittelt werden. Aus diesem Grund ist die Überprüfung der Matrixeffekt zu einem festen Bestandteil der Methodentwicklung geworden.

## 2.4 Carry-over von Substanzen aus dem Futtermittel in das Hühnerei

Die Einlagerung von Substanzen, z.B. pharmakologischen Wirkstoffen, in das Hühnerei resultiert aus dem Stoffwechsel und der Fortpflanzungsphysiologie der Henne. In einem Tier sind gleichzeitig viele Eidotter in verschiedenen Entwicklungsstadien vorhanden, was in Abbildung 8 deutlich wird.

Das Wachstum des Eigelbs erfolgt in Schichten. Die kleinsten Follikel wachsen bis zu 6 Wochen im Körper der Henne heran, bevor sie in Form eines Eies ausgeschieden werden. Täglich wird Dottermaterial schichtweise von außen angelagert. Das heißt, je länger die Exposition mit einer Chemikalie zurückliegt, desto weiter im Inneren des Dotters ist diese zu finden. In ausführlichen Untersuchungen von Donoghue et al. wurde bei 24stündiger Expositionsdauer das gleiche Einlagerungsschema bei allen getesteten Chemikalien nachgewiesen [133]. Bisher gibt es wenige Untersuchungen zum Transfer der Kokzidiostatika aus dem Futtermittel in das Ei. Die Forschungen von Donoghue et al. [134] lassen jedoch



**Abbildung 8:** Ovarium einer Henne und nach der Größe sortierte Dotter in den verschiedenen Stadien der Eigelb-Bildung [133]

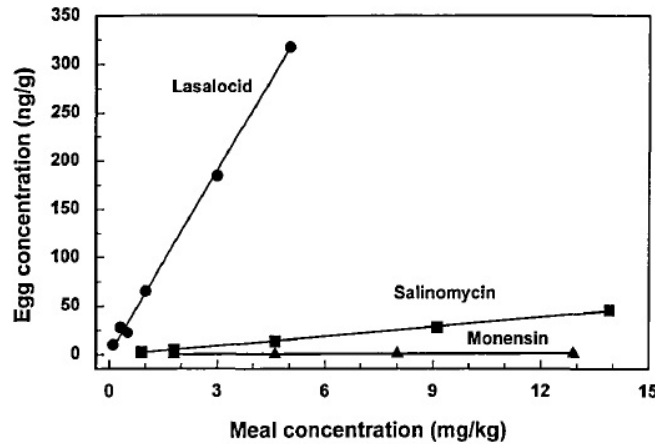
Vermutungen zu, dass trotz Einhaltung des festgelegten Höchstgehaltes im Futtermittel, der Höchstgehalt im Ei überschritten werden kann. Bei einer Exposition über einen längeren Zeitraum, die in der Praxis durchaus denkbar ist, können täglich Rückstände eingelagert werden, bis eine Sättigungskonzentration im Ei erreicht ist. Wissenschaftliche Studien haben gezeigt, dass die Einlagerung von Kokzidiostatika in das Hühnerei unterschiedlich stark erfolgt, selbst wenn die Substanzen kaum strukturelle Unterschiede aufweisen. Das Potential zur Einlagerung im Ei ist einerseits von der Bioverfügbarkeit bei oraler Aufnahme abhängig. Andererseits ist die Wasser- bzw. Fettlöslichkeit einer Substanz entscheidend bei der Einlagerung im Ei. Aufgrund der besonderen Physiologie der Henne ist eine Abschätzung des Wirkstofftransfers schwierig. Die größte Menge wird vermutlich während Bildung des Dotters (ca. 9 Tage) aus dem Ei-Follikel eingelagert. Außerdem können bereits in den ruhenden Follikeln Substanzen gespeichert werden.

#### 2.4.1 Untersuchung des Carry-over von Kokzidiostatika aus dem Futtermittel in das Hühnerei

Carry-over-Studien mit mehreren ionophoren Kokzidiostatika wurden von Kennedy et al. durchgeführt [38,41]. Verschiedene Konzentrationen von Lasalocid (0,1-5 mg/kg), Monensin (1,1-12,9 mg/kg) und Salinomycin (0,9-13,9 mg/kg) wurden jeweils Gruppen von fünf Hühnern über einen Zeitraum von mindestens sieben bis zu 17 Tagen verabreicht. Die Konzentration der Wirkstoffe in den Eiern nahm jeweils in den ersten Tagen stark zu und erreichte nach sechs Tagen (Monensin), neun Tagen (Salinomycin) bzw. sieben Tagen (Lasalocid) ein Plateau von maximal 4 µg/kg, 60 µg/kg bzw. 325 µg/kg. Die Einlagerung der Substanzen im Ei unterschied sich deutlich, wie in Abbildung 9 [37] dargestellt ist.

Des Weiteren wurde von dieser Arbeitsgruppe der Carry-over der chemischen Kokzidiostatika Nicarbazin und Halofuginon in das Hühnerei untersucht. Bei der Aufnahme

der Halofuginon-Konzentration entsprechend des Höchstgehaltes von 30 µg/kg Futtermittel wird der für Eier festgelegte Höchstgehalt von 6 µg/kg nicht erreicht [135].



**Abbildung 9:** Carry-over von Lasalocid, Salinomycin und Monensin: Korrelation der Konzentrationen im Futtermittel und der resultierenden Konzentration im Ei [37]

Auch in der ähnlich aufgebauten Studie mit Nicarbazin wurde bei der Konzentration von 1 mg/kg (Höchstgehalt im Futtermittel 0,5 mg/kg) der Grenzwert von 100 µg/kg im Ei nicht überschritten [136]. In allen Studien, in denen verschiedene Kokzidiostatika-Konzentrationen verabreicht wurden, ergab sich eine Korrelation zwischen der zugeführten Wirkstoffkonzentration und der nach Einstellung eines Gleichgewichtes im Ei erreichten Konzentration. Kennedy et al. [38,41] beschrieben, dass pro mg/kg Lasalocid im Futtermittel 63 ng/g im Ei eingelagert wurden, pro mg/kg Salinomycin im Futtermittel gingen 3,3 ng/g in das Ei über sowie 0,12 ng/g Monensin bei Futtermitteln mit 1 µg/kg Monensin.

Ein weiteres Ziel der Transferstudien ist die Ermittlung der Dauer bis zum Erreichen der Gleichgewichtskonzentration und der Rückstandsfreiheit der Eier nach dem Absetzen des kontaminierten Futtermittels. In einem Carry-over-Versuch mit Narasin untersuchten Rokka et al. [137] noch nach dem Absetzen des Narasin-haltigen Futters (2,5 mg/kg) die produzierten Eier. Im Eiweiß wurde zu keinem Zeitpunkt des Versuches Narasin nachgewiesen (Nachweisvermögen  $cc_{\beta} = 0,9 \mu\text{g/kg}$ ). Dagegen wurde im Eigelb sieben Tage nach Beginn der Fütterung eine durchschnittliche Narasin-Konzentration von 6,6 µg/kg, nach 14 Tagen 7,1 µg/kg und nach 21 Tagen 10,6 µg/kg erreicht. Nach der Absetzdauer von sieben Tagen waren maximal noch 1,4 µg/kg Narasin im Eigelb nachweisbar. Rokka et al. testeten in dieser Studie auch den Einfluss der Zubereitung der Eier. Diese wurden für 10 Minuten gekocht, Eigelb und Eiweiß wurden auch hier getrennt analysiert. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zu den in rohen Eiern ermittelten Narasin-Konzentrationen.

## 3 Experimenteller Teil

Die verwendeten Chemikalien, Standardsubstanzen, Geräte und Verbrauchsmaterialien sind unter Kapitel 7 aufgeführt.

### 3.1 Bestimmung von Kokzidiostatika mit LC-MS/MS

Von den 11 als Futtermittelzusatzstoff zugelassenen Kokzidiostatika standen nur zehn als Standardsubstanz zur Verfügung. Halofuginon Hydrobromid war nicht käuflich erhältlich. Zusätzlich zu den zugelassenen Stoffen wurde kontinuierlich das seit 2001 nicht mehr als Zusatzstoff zugelassene Kokzidiostatikum Ethopabat in die Methodenentwicklung mit einbezogen. Erfahrungen aus Vorarbeiten hatten gezeigt, dass diese Substanz wenig von Störungen betroffen war. Sie wurde deshalb zu Kontrollzwecken weiterhin in die Methode integriert. Für die Analytik der Kokzidiostatika standen einige interne Standardsubstanzen zur Verfügung. Die chemischen Kokzidiostatika Nicarbazin, Decoquinat und Robenidin waren in deuterierter Form verfügbar, Nicarbazin zusätzlich als  $^{13}\text{C}$ -markierter Standard. Für Diclazuril wurde das methyl-substituierte Diclazuril-bis verwendet. Die natürlich von Mikroorganismen synthetisierten Ionophore waren nicht in isopenmarkierter Form erhältlich. Aus diesem Grund wurde, wie auch in der Literatur [82,84] beschrieben, die strukturverwandte Verbindung Nigericin als interner Standard verwendet.

#### 3.1.1 Ermittlung der MS/MS-Parameter

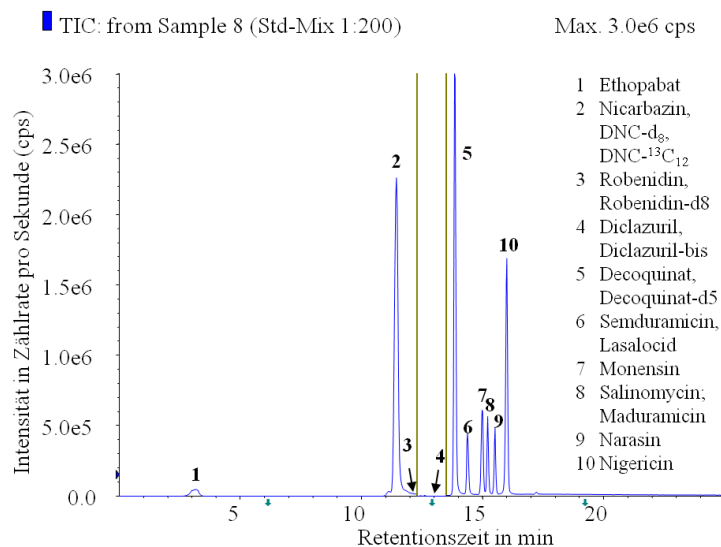
Durch direkte Infusion der Standardlösungen mit einer Spritzenpumpe in das Tandem-Massenspektrometer wurden zunächst der unter den vorliegenden Bedingungen geeignete Ionisationsmodus (positiv/negativ), die Vorläufer- und Fragmentionen der Analyten im Manual Tuning Modus ermittelt. Mit Hilfe der Softwarekomponente Compound Optimization wurden dann die Werte der Spannungsparameter (Declustering Potential, Entrance Potential, Collision Energy, Collision Cell Exit Potential) für die Fragmentierung und Detektion der Produkt-Ionen speziell für das Gerät optimiert. Diese wurden in einer Multi-Reaction-Monitoring-Methode (MRM) zusammengestellt. Die chemischen Kokzidiostatika wurden als Quasi-Molekulation, d. h. als protoniertes  $[\text{M}+\text{H}]^+$  bzw. deprotoniertes Molekül  $[\text{M}-\text{H}]^-$ , für die Detektion fragmentiert. Dagegen wurden Addukt-Ionen der Ionophore für die Messungen verwendet. Die während der Optimierung signalintensivsten Ionen waren die Natrium-Addukte  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  und Ammonium-Addukte  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ . Jeweils zwei bis drei spezifische MRM-Übergänge wurden in die MS-Methode aufgenommen. Nach der Kombination der HPLC- und der MS/MS-Methode erwiesen sich die Ammonium-Addukte der ionophoren Kokzidiostatika als besser geeignet hinsichtlich Signalintensität und Stabilität der Messungen. Eine Auflistung der MRM-Übergänge und der zugehörigen MS-Parameter ist im Kapitel 7 Material und Methoden zu finden.

### 3.1.2 Entwicklung der HPLC-Methode

Bei der Entwicklung der LC-Methode wurde großer Wert auf eine möglichst vollständige chromatographische Trennung aller Analyten gelegt. Dadurch sollte die gegenseitige Beeinflussung der Analyten während der Ionisierung ausgeschlossen werden.

#### Fließmittel und Trennsäule

Es wurden Umkehrphasen-Trennsäulen mit C18- und C8-Belegung sowie Eluentgemische aus Acetonitril bzw. Methanol mit Wasser getestet. Methanol erwies sich aufgrund der niedrigeren Elutionskraft als ungeeignet für die Chromatographie bei dieser Multimethode. Dies zeigte sich durch breite Peakformen mit starkem Fronting und mangelnde Auflösung der Analyten. Die Methanol-Wasser-Mischung des Gradienten war zu polar, sodass die Analyten z.T. unvollständig gelöst waren, was zu einer Überladung der mobilen Phase führte. Dadurch kam es zu einer Verzögerung der Elution der Analyten und die dafür typische asymmetrische Peakform (Fronting) entsteht. [138] Dagegen wurden mit Acetonitril scharfe, größtenteils basisliniengetrennte Peaks erzielt. Auf den getesteten C18-Säulen war die Retention der Ionophore zu stark, sodass sehr breite Peaks auftraten und einige Analyten auch mit reinem Acetonitril nicht von der Säule eluierten. Die optimale Trennung der Analyten sowie schmale, symmetrische Peakformen wurden auf den Säulen mit C8-Material (Hypersil Gold, Luna) erzielt. Ein Gradient von 30 % auf 100 % Acetonitril (siehe Tabelle 32) war dazu am besten geeignet (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Chromatogramm des Kokzidiostatika-Standard-Mix (Tabelle 6, Verdünnung um Faktor 200) unter optimierten LC-MS/MS-Bedingungen

Aufgrund der Säulendimensionen wurde eine Flussrate von 200 µl/min gewählt. Zur Optimierung der Säulentemperatur wurden verschiedene Temperaturen (30 °C, 40 °C, 50 °C) getestet. Bei der höchsten Temperatur wurde das beste Ergebnis hinsichtlich der



Trennung der Analyten erzielt. Ein temperaturbedingter Abbau der Substanzen wurde nicht beobachtet. Zur Erhöhung der Ionisationsausbeute wird der wässrigen Komponente des Eluenten üblicherweise ein Salz oder eine organische Säure zugesetzt. Für die Multimethode wurden Ammoniumformiat und -acetat in verschiedenen Konzentrationen sowie Ameisensäure und Essigsäure als Zusätze getestet. Die höchsten Signalintensitäten waren mit 5 mM Ammoniumacetat-Puffer zu verzeichnen. Zusätzlich wurde Essigsäure zugegeben, da durch die hiermit erreichte Erhöhung der Löslichkeit eine Verbesserung der Peakform von Robenidin einherging.

### **Injektionssystem – Maßnahmen gegen Verschleppungen**

In der Spurenanalytik können Verschleppungen eines Analyten von einer Messung zur nächsten, das Ergebnis stark beeinflussen. Zur Vermeidung von Kontaminationen über das Injektionssystem des automatischen Probengebers wurde ein Nadelwaschprogramm in die Methode integriert. Je 5 µl Acetonitril bzw. Acetonitril-Wasser wurden nacheinander aufgezogen und in ein leeres Vial entlassen. Danach wurde die Nadel durch Eintauchen in ein Vial mit Acetonitril-Wasser von außen gespült. Das Vial wird dazu nicht verschlossen um eine Kontamination durch das Septum zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Injektion der Probelösung.

#### **3.1.3 Optimierung der Ionisationsparameter**

Für die Entwicklung der Methode wurden Standardeinstellungen der Quellenparameter verwendet. Nach der Auswahl der optimalen Flussrate, Fließmittelzusammensetzung und Gradient wurden die Gasstrom- und Spannungsparameter für die Ionisation (Curtain Gas, Ion Source Gas 1 (nebulizer gas) und Ion Source Gas 2 (heating gas), Ion Transfer Voltage, Vaporizer Temperature) mittels Fließinjektionsanalyse (Flow Injection Analysis – FIA) optimiert. Dazu werden die HPLC-Flussrate und eine für die Retentionszeit der Analyten repräsentative Fließmittelzusammensetzung verwendet. Ohne Trennsäule wird dann eine Standardlösung in die HPLC injiziert. Anhand eines Analyten können aufgrund der kurzen Laufzeit von einer Minute in kurzer Zeit mehrere Varianten aller Quellparameter getestet werden. Die optimalen Bedingungen werden von der Software automatisch in einer Methode zusammengestellt.

#### **3.1.4 Weitere Optimierungsschritte**

Die MS/MS-Methode wurde in mehrere Retentionszeitabschnitte (Perioden) eingeteilt, zwischen denen der Ionisationsmodus, entsprechend der Polarität der in der jeweiligen Periode eluierenden Analyten, gewechselt wurde. Durch die Veränderung der Trennsäule nach der Injektion einer Vielzahl von Matrixproben und die Unterschiede zwischen den Chargen des Säulenmodells waren regelmäßig Anpassungen der Periodengrenzen erforderlich. Besonders schwierig erwies sich die Detektion von Robenidin und Nicarbazin bei unterschiedlicher Polarität, da diese nahezu zeitgleich eluierten. Dieses Problem konnte im späteren Verlauf der Untersuchungen gelöst werden, indem die Polarität kontinuierlich umgeschaltet wurde (polarity switching). Diese Funktion kann in der ersten von

mehreren Perioden in einer Methode genutzt werden. Nachteil des polarity switching ist die hohe Umschaltzeit des Gerätes von 700 ms pro Schaltvorgang zwischen positiver und negativer Ionisation. Durch das kontinuierliche Umschalten geht Messzeit pro MRM-Übergang und damit Empfindlichkeit verloren. Im Fall sehr niedriger Konzentrationen ist demzufolge die Messung mit polarity switching ungünstig.

### 3.2 Extraktion von Kokzidiostatika aus Futtermitteln zur Untersuchung der Matrixeffekte

Verschiedene Extraktionslösungsmittel und Extraktionsmethoden aus der Literatur wurden hinsichtlich der Wiederfindung und der Matrixeffekte verglichen. Hierfür wurden pre- und post extraction additon Experimente durchgeführt und sowie Blindwertmatrixextrakte mit der PCI Technik untersucht. Tabelle 3 zeigt eine Zusammenstellung der getesteten Lösungsmittel und Extraktionstechniken.

**Tabelle 3:** Zur Extraktion von Kokzidiostatika aus Futtermitteln getestete Extraktionsmethoden und Extraktionslösungsmittel

Extraktionsmethode	Verwendete Lösungsmittel
ASE	Acetonitril (ACN) Methanol (MeOH)
Fest-Flüssig-Extraktion im Überkopfschüttler (SLE)	Acetonitril (ACN) Acetonitril-Wasser 9+1 (ACN+H <sub>2</sub> O 9+1) Acetonitril + 1 % Essigsäure (ACN + 1 % Ac) Methanol (MeOH) Methanol-Wasser 9+1 (MeOH+H <sub>2</sub> O 9+1)
Ultraschallextraktion (USE)	Acetonitril (ACN) Acetonitril-Wasser 9+1 (ACN+H <sub>2</sub> O 9+1) Acetonitril + 1 % Essigsäure (ACN + 1 % Ac) Methanol (MeOH) Methanol-Wasser 9+1 (MeOH+H <sub>2</sub> O 9+1)

Für alle Experimente wurden jeweils die gleiche Menge Blindwertfuttermittel eingewogen und mit dem gleichen Volumen des Lösungsmittels extrahiert, sodass immer die gleiche Matrixkonzentration vorlag.

#### 3.2.1 Accelerated Solvent Extraction – ASE

Die Accelerated Solvent Extraction (ASE) nutzt erhöhte Temperaturen für eine gesteigerte Extraktionseffizienz. Die Extraktion erfolgt bei erhöhtem Druck, um das verwendete Lösungsmittel unter dem Siedepunkt zu halten. Das Probenmaterial wird in der Regel zur Extraktion mit einem Dispersionsmittel vermengt, um die zur Verfügung stehende Oberfläche zu vergrößern und eine vollständige Benetzung der Probe mit dem

Lösungsmittel zu gewährleisten. Für die ASE von Futtermittel wurden 5 g Probe in 22 ml-ASE-Zellen mit dem Dispersionsmittel Isolute HM-N (modifizierte Diatomenerde) vermischt, sodass die Zellen vollständig gefüllt waren. Die Extraktion erfolgte mit der in Tabelle 5 beschriebenen Methode mit einer ASE 200 Anlage mit Solvent Controller und Compressor Modell 6-4 von Dionex. Der Extrakt wurde in 20 ml Messkolben überführt, das ASE-Vial mit dem Extraktionsmittel gespült und der Messkolben zur Marke aufgefüllt.

**Tabelle 4:** ASE-Methode zur Extraktion von Kokzidiostatika aus Futtermitteln

Parameter	Wert
Vorheizzeit	5 min
Heizzeit	5 min
Dauer der statischen Extraktion	10 min
Flush	100 %
Purge	120 s
Anzahl der Zyklen	2
Druck	100 bar
Temperatur	100 °C

### 3.2.2 Extraktion im Überkopfschüttler (SLE) und im Ultraschallbad (USE)

In 50 ml PE-Schraubgefäßen wurden 5 g Futtermittel mit 20 ml Extraktionslösung versetzt und eine Stunde über Kopf geschüttelt. Ebenfalls in 50 ml PE-Schraubgefäßen wurden 5 g Futtermittel mit 20 ml Extraktionslösungsmittel für 15 min im Ultraschallbad extrahiert.

### 3.2.3 Behandlung der Rohextrakte

Sofern kein Clean-up (siehe Kapitel 3.4) vorgesehen war, wurden die Rohextrakte in 50 ml PE-Zentrifugenröhrchen bei 3000 g und 10 °C für 15 min zentrifugiert und der Überstand zur Aufbewahrung in 22 ml Schraubgläsern überführt. Ein definiertes Volumen des zentrifugierten Rohextraktes wurde unter Stickstoffstrom bei 45 °C im Thermoblock zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde im ursprünglichen Volumen eines Lösungsmittelgemisches entsprechend der Anfangszusammensetzung des HPLC-Gradienten gelöst. Eventuelle feste Rückstände wurden durch Zentrifugalfiltration über eine 0,2 µm Nylonmembran für 1 min bei 10.000 g entfernt.

### **3.3 Extraktion von Eiweiß, Eigelb und Gesamtei zur Untersuchung von Matrixeffekten (Kokzidiostatika-Multimethode)**

Für die Extraktion von Eiprobe n eignet sich sehr gut Acetonitril als Lösungsmittel. Dieses fällt Proteine besser als viele andere organische Lösungsmittel. Zusätzlich können Säuren wie Ameisensäure unterstützend zur Proteinfällung dem Lösungsmittel zugegeben werden. Von den Matrices Eiweiß, Eigelb und Gesamtei wurden jeweils 2 g mit 10 ml Acetonitril extrahiert. Die Rohextrakte wurden analog zu den Futtermittelproben behandelt.

### **3.4 Probenaufreinigung zur Untersuchung von Matrixeffekten (Kokzidiostatika-Multimethode)**

Die Futtermittel extrakte wurden mit Hilfe verschiedener Clean-up-Konzepte (in den folgenden Kapiteln 3.4.1 bis 3.4.4 beschrieben) gereinigt, während für die Extrakte der Eikomponenten ausschließlich die dispersive SPE angewendet wurde.

#### **3.4.1 Dispersive Festphasenextraktion (dispersive solid phase extraction – dSPE)**

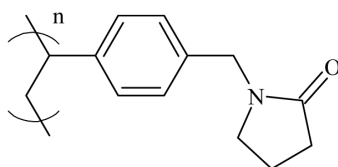
Die dispersive SPE ist ein nicht-retentives Verfahren. Dabei wird der Rohextrakt einer Probe auf eine definierte Menge losen Festphasenmaterials gegeben und gemischt. Störende Matrixbestandteile werden an der Festphase adsorbiert, während der Analyt in Lösung bleiben soll. Diese Aufreinigungsmethode wurde ursprünglich für die Routineanalytik von Pestiziden entwickelt, fand aber auch Anwendung in anderen Bereichen. Die Festphase enthält als Grundlage ein Material aus primärem und sekundärem Amin, welches je nach Matrix mit Magnesiumsulfat, einem Umkehrphasenmaterial oder mit Aktivkohle ergänzt wird. In der vorliegenden Arbeit wurden dispersive Festphasen mit C18-Material und mit Aktivkohle miteinander verglichen. Die Ei-Extrakte wurden entsprechend der Vorgaben des Herstellers gereinigt. Dazu wurden 6 ml des Acetonitril-Rohextraktes in das jeweilige Röhrchen gegeben. Die Festphasenextraktion erfolgte durch intensives Mischen zunächst für 45 s auf dem Vortex-Mischer und anschließend 15 min im Ultraschallbad. Nach der Zentrifugation (10 min, 3000 rpm) wurde der Überstand abgenommen und ein Aliquot eingedampft, zurückgelöst und filtriert, wie in Abschnitt 3.2 beschrieben.

Für die Reinigung der Futtermittel extrakte mittels dispersive SPE wurden die Extraktvolumina variiert, um verschiedene Matrixkonzentrationen zu vergleichen. Dazu wurden 3 ml und 6 ml Rohextrakt in das Röhrchen gegeben. Nach der Zentrifugation wurden Aliquote der gereinigten Extrakte zur Trockne eingedampft und im ursprünglichen Volumen, sowie in einem Viertel und der Hälfte dessen wieder aufgenommen. Die Dotierung der Extrakte wurde so vorgenommen, dass für die pre- und postextraktion addition Experimente (siehe Kapitel 3.7.1) jeweils die gleiche Analytkonzentration bei variierender Matrixkonzentration vorlag. Die dispersive Festphasenextraktion wurde zusätzlich ohne Probenmaterial durchgeführt, um mögliche Störungen durch Bestandteile oder Begleitsubstanzen des Festphasenmaterials zu betrachten. Dazu wurden 3 ml und 6 ml reines Acetonitril mit dSPE gereinigt. Aliquote des behandelten Acetonitrils

wurden eingedampft und im gleichen Volumen des Lösungsmittelgemisches der HPLC-Startbedingungen gelöst.

### 3.4.2 Festphasenextraktion - Strata X polymer reversed phase

Im Gegensatz zur dispersiven SPE wird bei der konventionellen Festphasenextraktion der Analyt auf der stationären Phase festgehalten. Ursprünglich wurden Umkehrphasen-SPE-Kartuschen auf Kieselgelbasis hergestellt. Inzwischen werden zunehmend Polymerphasen entwickelt. Vorteil dieser SPE-Variante ist die leichte Handhabbarkeit. Sind die Kartuschen einmal konditioniert, können diese nicht mehr durch Trockenlaufen dekonditioniert werden. Die zwei Hauptfunktionalitäten des hier verwendeten Polymersystems, ein Benzolring und N-Vinylpyrrolidon, ermöglichen die Retention von Molekülen mit unterschiedlichen Eigenschaften hinsichtlich Azidität und Polarität.



**Abbildung 11:** Grundbaustein der Strata<sup>TM</sup>X polymeric reversed phase Festphase [139]

Für die Aufreinigung der Futtermittelproben wurden polymer RP-Kartuschen mit 200 mg Bettmasse für 3 ml Probenvolumen verwendet. Die Festphasenextraktion erfolgte mit Gemischen aus Wasser und Acetonitril. Vorversuche ergaben, dass mit 3 ml 50 % Acetonitril gewaschen und mit 3 ml 90 % Acetonitril eluiert werden konnte. Zur Variation der Matrixkonzentration wurden 1 ml oder 4 ml Rohextrakt eingedampft (entsprechend 0,25 g und 1 g Futtermittel pro Milliliter Extraktionslösung), und jeweils in 1 ml 10 % Acetonitril, zum Aufgeben auf die Kartusche, zurückgelöst. Die Elutionsfraktionen wurden für die Messung eingedampft, in 1 ml 30 % Acetonitril gelöst und zentrifugalfiltriert.

### 3.4.3 Festphasenextraktion – Oasis HLB

Eine weitere Umkehrphasen-SPE-Kartusche auf Polymerbasis wurde getestet. Die Oasis HLB Kartusche ist laut Hersteller sehr gut für allgemeine Anforderungen geeignet, da die Belegung der Festphase, ähnlich wie die Strata X, hydrophile und lipophile Bereiche aufweist (Abbildung 12).

Es handelt sich um ein Copolymer aus N-Vinylpyrrolidon zur Retention polarer Substanzen und Divinylbenzol, welches unpolare Moleküle retardierte. Die Aufreinigung erfolgte entsprechend der Empfehlung des Herstellers. Dazu wurde die Kartusche mit Methanol konditioniert und mit Wasser equilibriert. Der Probenextrakt wurde gelöst in Acetonitril-Wasser 1+9 aufgegeben. Anschließend wurde mit Methanol-Wasser 1+19 gewaschen und mit reinem Methanol von der Kartusche eluiert.

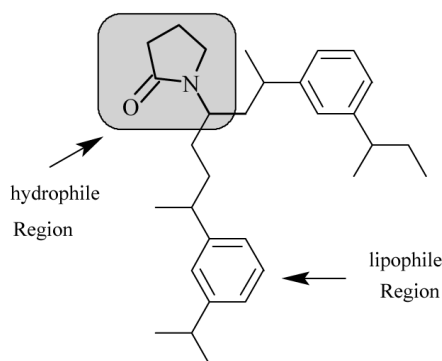


Abbildung 12: Copolymer der Oasis® HLB Festphase [140]

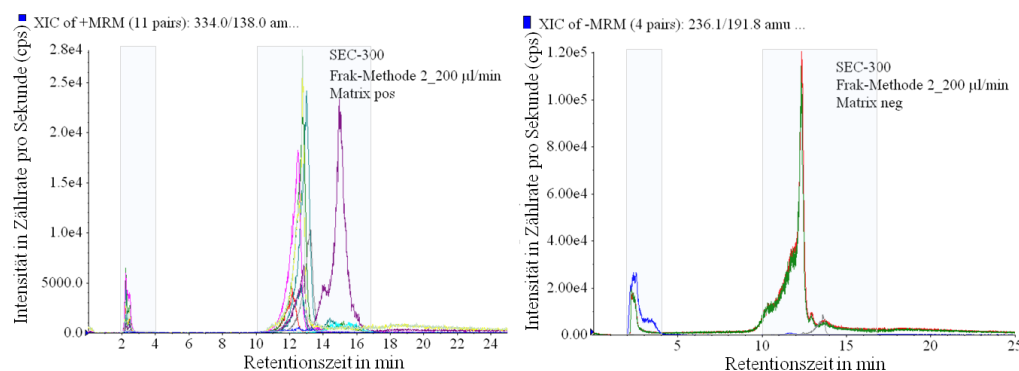
#### 3.4.4 Fraktionierung mittels Größenausschlusschromatographie

Die Trennung von Analyten und Matrixkomponenten setzt Unterschiede in deren Eigenschaften voraus. Die dispersive und normale Festphasenextraktion nutzen Unterschiede in der Polarität der Substanzen. Sowohl die Kokzidiostatika als auch die störenden Bestandteile der Matrix Futtermittel sind relativ unpolar, sodass die Waschschritte der Festphasenextraktion nur bedingt zur Trennung dieser Substanzgruppen führen können. Aus diesem Grund sollte eine Clean-up-Methode basierend auf einer anderen Stoffeigenschaft getestet werden.

Mit der Größenausschlusschromatographie können Substanzen aufgrund ihrer Molekülmasse und -größe getrennt werden. Davon ausgehend, dass hauptsächlich Fett- und Proteinbestandteile für die Matrixeffekte bei der Kokzidiostatika-Analytik in Futtermittel und Ei verantwortlich sind, erschien eine Trennung mithilfe dieser Methode möglich. Die Ionophoren Kokzidiostatika sind zwar relativ große Moleküle mit bis zu 935 Da, sie sind jedoch bei entsprechendem pH-Wert in der Lage, ringförmige und dadurch kompakte Strukturen zu bilden. Diese nehmen bei gleicher Molekülmasse geringere Volumina ein als kettenförmige Strukturen, wie zum Beispiel Phospholipide, und können somit von diesen getrennt werden. Peptide und Polypeptide sind weit über 1000 Da groß. Bei der Verwendung einer Größenausschluss säule mit dem entsprechenden Ausschlussvolumen würden diese großen Moleküle im Totvolumen eluieren, während die etwas kleineren Ionophore zumindest kurzzeitig retardiert würden. Die chemischen Kokzidiostatika würden mit maximal 421 Da auf der Säule festgehalten.

Das Reinigungsvermögen von Größenausschluss säulen wurde anhand von drei Materialien mit verschiedenen Ausschlussvolumina getestet (60 Å, 120 Å, 300 Å). Die verwendeten Biobasic SEC-Säulen kombinieren die Umkehrphaseneigenschaften mit dem Größenausschluss. Deshalb sind sie zur Abtrennung von Matrixbestandteilen, insbesondere Proteinen, geeignet, während kleinere, im Vergleich dazu leicht polare Moleküle retardiert werden. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften des Säulenmaterials ähnelt die Retentionsreihenfolge der Kokzidiostatika der auf den RP8 bzw. RP18-Säulen, wobei die Trennung weniger stark ist. Die Überprüfung der Retentionszeiten und die Optimierung des Gradienten zur Fraktionierung erfolgten mit der LC-MS/MS. Die SEC-300-Säule

war nach Beurteilung der Vortests am besten geeignet. Abbildung 13 zeigt das Chromatogramm einer dotierten Blankfuttermittelprobe, die Retentionsbereiche der Fraktionen sind markiert. Fraktion 1 (2 bis 4 min) und Fraktion 2 (10 bis 17 min) wurden getrennt voneinander weiter verarbeitet.



**Abbildung 13:** Extracted Ion Chromatogramme (XIC) der Fraktionierungsmethode anhand einer dotierten Futtermittelprobe (links: positive Ionisation, rechts: negative Ionisation)

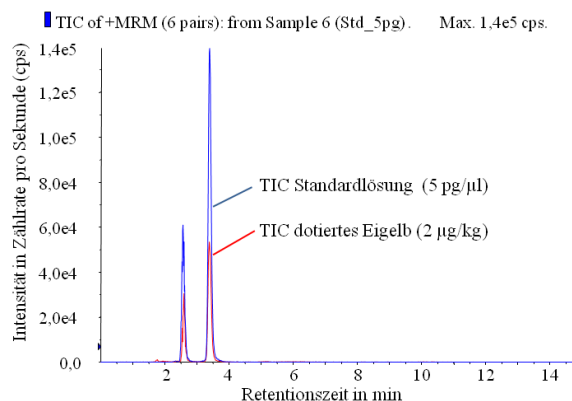
Anschließend wurden die Fraktionierungsmethoden auf die HPLC-UV mit Fraktions-sammler übertragen. Die Futtermittel-extrakte wurden sowohl unbehandelt als auch vor-gereinigt mittels dSPE mit PSA C18-Material auf der SEC-Säule fraktioniert. Die Ro-hextrakte bzw. dSPE-Extrakte wurden vor der Fraktionierung um Faktor 10 konzen-triert, um ein möglichst geringes Injektionsvolumen (50 µl) verwenden zu können. Die Fraktionen wurden anschließend so aufbereitet, dass bei vollständiger Wiederfindung, in den Fraktionen die gleiche Konzentration vorlag wie im Rohextrakt. Dazu wurden die Fraktionen eingedampft, im Injektionsvolumen aufgenommen (50 µl Acetonitril) und um Faktor 10 mit dem Lösungsmittelgemisch der HPLC-Anfangsbedingungen verdünnt. Das Matrix-Analyt-Verhältnis entsprach somit dem aller anderen Versuche. Bis auf Ethopa-bat waren alle Analyten in der Fraktion 2 enthalten.

### 3.5 Entwicklung der Methoden zur Bestimmung von Maduramicin in Futtermittel, Eiweiß und Eigelb

#### 3.5.1 LC-MS/MS-Methodenentwicklung

Die massenspektrometrische Detektion Maduramicins erfolgte im MRM-Modus. Jeweils drei Übergänge der Ammonium-Addukte von Maduramicin und Nigericin (IS) auf spe-zifische Fragmentationen wurden erfasst. Die Parameter der Electrospray-Ionisation und der MS-Detektion sind in Kapitel 7.7.3 aufgelistet. Für den Nachweis von Maduramicin wurde eine LC-MS-MS-Methode mit möglichst kurzer Laufzeit entwickelt. Das chroma-tographische Verhalten des Ionophors war bereits durch die Entwicklung der Multime-thode bekannt. Aufgrund dessen wurde ein hoher Acetonitrilanteil verwendet. Bei 90 % Acetonitril und 10 % Ammoniumacetat-Puffer 5 mM eluierte Maduramicin nach ca. 2,6 min von der C8-Säule, der interne Standard Nigericin nach 3,6 min. Die Laufzeit der

Methode wurde zunächst auf 10 min festgelegt. Während der Validierung der Methode für die Analyse in Futtermittel, Eiweiß und Eigelb traten Schwankungen der Retentionszeit und der Signalintensität auf. Die Ursache waren Probenbestandteile, die innerhalb der kurzen Laufzeit nicht vollständig von der Trennsäule eluiert wurden und dadurch in folgende HPLC-Läufe verschleppt wurden.



**Abbildung 14:** Total Ion Chromatogramm (TIC) von Maduramicin (Mad) und dem internen Standard Nigericin (Nig) in Standardlösung und dotiertem Eigelb

Durch die Integration eines Spülschrittes mit 50 % Ammoniumacetat-Puffer nach der Elution des Analyten konnten diese Schwankungen deutlich reduziert werden. Der endgültige Gradient ist in im Anhang in Tabelle 40 beschrieben. Abbildung 14 zeigt zwei Beispielchromatogramme für Maduramicin und Nigericin in Standardlösung und dotiertem Eigelb.

#### 3.5.2 Probenaufarbeitung

##### Extraktionstests

Die Extraktion von Maduramicin aus den Matrices Eiweiß, Eigelb und Futtermittel sollte möglichst mit dem gleichen Lösungsmittel erfolgen. Die Extraktionsausbeuten verschiedener Lösungsmittel (Acetonitril, Acetonitril mit 1 % Ameisensäure, Methanol, Methanol mit 1 % Ameisensäure, Acetonitril/Methanol 1+1) wurden getestet. Für die Extraktionstests wurden je 2 g Eiweiß bzw. Eigelb auf einen Maduramicin-Gehalt von 20 µg/kg dotiert und mit 4 ml Lösungsmittel zunächst auf dem Vortex-Mischer und anschließend für 15 min im Ultraschallbad extrahiert. Von einem Blankfuttermittel wurden je 5 g eingewogen und nach der Zugabe des Standards mit 20 ml Extraktionslösung zur Extraktion eine Stunde über Kopf geschüttelt. Der interne Standard Nigericin wurde in der gleichen Konzentration vor der Extraktion zugegeben. Nach Zentrifugation bei 4000 rpm wurde ein Aliquot des Überstands unter Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft und in einem Fünftel (Ei) bzw. der Hälfte (Futtermittel) des Volumens Acetonitril/Wasser 9+1 aufgenommen. Diese Lösung wurde durch eine 0,2 µm Nylon-Membran zentrifugalfiltriert und mit LC-MS/MS analysiert. Entsprechende post extraction addition Versuche

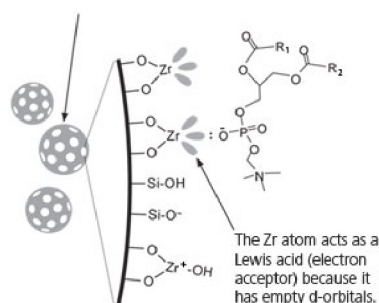


wurden ebenfalls durchgeführt und so die Wiederfindungsraten, Matrixeffekte und Prozesseffizienzen berechnet (siehe Kapitel 4.1.1).

Mit dem Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und Ameisensäure wurden zufriedenstellende Wiederfindungsraten bei möglichst geringem Matrixeffekt für alle drei vorliegenden Matrices erzielt. Zur Reduktion der Matrixeffekte bei der Analyse der Eigelbproben wurde ein Reinigungsschritt eingeführt.

### Aufreinigung der Eigelb-Extrakte

Zur Reinigung der Eigelbextrakte wurde eine Festphasenextraktion durchgeführt. Die verwendeten HybridSPE Proteine Precipitation Kartuschen wurden ursprünglich für die Aufreinigung von Blutplasma proben entwickelt. Die Proteine werden dabei direkt in der Kartusche durch ameisensaures Acetonitril gefällt und anschließend von einem Filter festgehalten. Die Festphase aus Kieselgel besitzt eine Zirkonium-Belegung, die mit Phospholipiden wechselwirkt (Abbildung 15) und diese dadurch auf der Kartusche festhält. Phospholipide können starke Matrixeffekte bei der LC-MS/MS-Analyse verursachen. [131] Da nahezu ein Drittel des Fettanteils des Eidotters aus Phospholipiden besteht, kann die Entfernung dieser Substanzen zu einer deutlichen Verbesserung der Analysenergebnisse führen.



**Abbildung 15:** Festphasenmaterial der HybridSPE - Wechselwirkung der Zirkonium-Belegung Phospholipiden [141]

Die Eigelbproben wurden wie zuvor beschrieben mit 1 % Ameisensäure in Acetonitril extrahiert und das gefällte Protein durch Zentrifugation abgetrennt. Aufgrund des hohen Proteingehaltes von Eidotter wäre eine Verstopfung der für Blutplasma vorgesehenen Kartuschen sehr wahrscheinlich. Die Festphase der Hybrid-SPE muss weder konditioniert noch equilibriert werden. Das Zentrifugat des Eigelbextraktes wurde direkt auf die Kartusche gegeben. Da diese Festphasenextraktion nicht retentiv ist, d. h. nur Probenbestandteile auf der Kartusche festgehalten werden, sind keine Wasch- oder Elutions-schritte nötig. Bei einer Bettmasse von 30 mg wurden jeweils 1,3 ml Rohextrakt aufgegeben und unter Normaldruck die Festphase passieren gelassen. Der Eiweiß-Rohextrakt und der gereinigte Eigelb-Extrakt wurden in gleicher Weise weiterverarbeitet. Jeweils 1 ml des Extraktes wurde unter Stickstoffstrom bei 45 °C im Thermoblock zur Trockne eingedampft. Der Trocknungsrückstand wurde in 200 µl Acetonitril-Wasser 9+1, der Anfangszusammensetzung des HPLC-Gradienten, aufgenommen. Diese Lösung wurde

durch Zentrifugalfilter mit 0,2 µm Nylonmembran für 1 min bei 5000 RZB zentrifugal-filtriert und anschließend in ein Autosampler-Vial mit Insert überführt. Aliquote des Futtermittel-Extraktes wurde auf die gleiche Weise eingedampft und in 500 µl des Lösungsmittelgemisches aufgenommen. Die Filtration erfolgte entsprechend der Eiprobe.

## 3.6 Bestimmung von Carbadox und Olaquinox in Futtermitteln

### 3.6.1 LC-MS/MS-Methode

CBX und OQX wurden im ESI-Modus positiv ionisiert, und jeweils drei MRM-Übergänge von den  $[M+H]^+$ -Ionen auf spezifische Fragmentationen detektiert. Die Optimierung der MS-Parameter erfolgte durch direkte Infusion einer Standardlösung in das Tandem-Massenspektrometer. Die Einstellungen der Quellparameter wurden für die verwendete HPLC-Methode mittels Fließinjektionsanalyse optimiert. Alle MS-Parameter sind in Kapitel 7.7.4 zusammengestellt.

Die chromatographische Trennung der Analyten erfolgte auf einer C18-Säule mit „fused core“-Material (Ascentis Express C18; 150x4,6 mm, 2,7 µm), bei einem Fluss von 200 µl/min und 50 °C Säulentemperatur. Die Fließmittel A (5 mM Ammoniumformiat-Puffer) und B (Methanol) wurden in einem Gradienten (siehe Tabelle 43) verwendet. Diese Methode wurde zur Untersuchung der Matrixeffekte in Abhängigkeit von der Probenaufarbeitung verwendet.

Zur Untersuchung des Einflusses des Trennsäulenmaterials auf den Matrixeffekt wurden zusätzlich eine C18-Säule mit konventionellem Material (Luna Aqua 3u C18 125 A 75x2,0 mm, 3 µm) und eine Säule mit HILIC-Material (hydrophilic interaction liquid chromatography) verwendet (Luna 3u HILIC 150x3,0 mm, 3 µm). Für beide Säulen wurden Art und Zusammensetzung der mobilen Phase für eine optimale Trennung und Peakform der Analyten gewählt. Auf der Luna Aqua wurden Ammoniumformiat und Methanol verwendet, auf der HILIC Ammoniumformiat und Acetonitril. Die verwendeten Gradienten sind in Tabelle 44 und Tabelle 45 zusammengestellt.

### 3.6.2 Probenaufarbeitung von Futtermittel zur Untersuchung der Matrixeffekte

Zur Extraktion von CBX und OQX aus Futtermitteln wurden die ASE und Ultraschallextraktion mit verschiedenen Lösungsmitteln (ACN, MeOH, ACN+MeOH 1+1, ACN+MeOH 7+3, ACN+MeOH+H<sub>2</sub>O 7+7+6) verglichen. Für die ASE wurden zusätzlich ACN mit 2 % Ameisensäure und ACN+MeOH 7+3 mit 2 % Ameisensäure verwendet. Des Weiteren wurden ausgewählte Futtermittel-extrakte mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion entfettet oder mit Oasis HLB SPE gereinigt. Die Dotierung von Futtermittel bzw. Futtermittel-extrakten für die Untersuchung von Matrixeffekten erfolgte im Konzentrationsbereich der für die Analyten geforderten Mindestleistungsgrenze von Analysenmethoden (CBX: 4 mg/kg; OQX: 3 mg/kg). Die dotierte Konzentration betrug für beide Analyten 1 µg/ml bzw. 3,3 mg/kg Futtermittel.

## Extraktion

Für die Extraktion mittels ASE wurden 7,5 g Futtermittel und 2,5 g des Dispersionsmittels Isolute HM-N eingewogen, gemischt und in 22 ml-ASE-Zellen gefüllt. Der Zellausgang wurde mit einem Glasfaserfilter versehen. Mit den o.g. Lösungsmitteln erfolgte die ASE entsprechend der in Tabelle 4 aufgeführten Parameter.

**Tabelle 5:** ASE-Methode zur Extraktion von CBX und OQX aus Futtermitteln

Parameter	Wert
Vorheizzeit	5 min
Heizzeit	5 min
Dauer der statischen Extraktion	5 min
Flush	60 %
Purge	100 s
Anzahl der Zyklen	2
Druck	100 bar
Temperatur	80 °C

Die in den ASE-Vials gesammelten Extrakte wurden auf ca. 22 ml eingedampft (Stickstoffstrom, 40 °C) und in 25 ml-Messkolben überführt. Die ASE-Vials wurden mit 2 ml Extraktionslösungsmittel gespült, die Spüllösung ebenfalls in den Messkolben gegeben bevor dieser zur Marke aufgefüllt wurde. Aliquote dieser Rohextrakte wurden entweder für die Aufreinigung verwendet oder direkt zur Messung vorbereitet. Dazu wurde ein definiertes Volumen an Extrakt (500 µl) zur Trockene eingedampft und im gleichen Volumen MeOH+H<sub>2</sub>O 1+1 (Anfangszusammensetzung des HPLC-Gradienten) aufgenommen. Die rekonstituierte Lösung wurde bei 14000 g für 1 min über 0,45 µm Zentrifugalfilter (Nylon) filtriert und in Autosampler-Vials überführt.

Die Ultraschallextraktion (USE) erfolgte in verschließbaren 50 ml-PE-Röhrchen. Nach der Einwaage von 7,5 g Futtermittel wurden 20 ml Extraktionslösung zugegeben und 10 min im Ultraschallbad extrahiert. Die Extraktionsröhrchen wurden zentrifugiert (10 min, 10 °C, 3000 g) und der Überstand in 25 ml-Messkolben überführt. Anschließend wurde der Zentrifugationsrückstand mit 4 ml Extraktionslösung gemischt (Vortex). Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand in den Messkolben gegeben und dieser zu Marke aufgefüllt. Die USE-Extrakte wurden ohne weitere Aufreinigung zur Messung vorbereitet, wie für die ASE-Extrakte beschrieben.

## Probenaufreinigung

Die Aufreinigung von Proben zur Bestimmung von CBX und OQX wurde am Beispiel der ASE-Extrakte (liquid-liquid extraction – LLE) mit ACN + 2 % Ameisensäure durchgeführt. Zur Entfettung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion wurden Aliquote à 2,5 ml der Rohextrakte in 12 ml Reagensgläsern (NS 14,5) pipettiert und mit dem gleichen Volumen eines unpolaren organischen Lösungsmittels (n-Hexan, n-Pentan oder Iso-Octan)

versetzt. Nach kräftigem Mischen auf dem Vortex-Mischer (15 s) wurde zentrifugiert (5 min, 10 °C, 470 g) und die unpolare Phase wurde abgenommen. Anschließend wurde der Entfettungsschritt mit frischem Lösungsmittel wiederholt. Die entfetteten Extrakte wurden ebenfalls durch Eindampfen, Aufnehmen in MeOH+H<sub>2</sub>O 1+1 und Zentrifugalfiltration zur Messung vorbereitet.

Des Weiteren wurden die Rohextrakte (ASE mit ACN + 2 % Ameisensäure) mittels Festphasenextraktion (Oasis HLB) gereinigt. Dazu wurden Aliquote des Rohextraktes zur Trockene eingedampft und in Methanol+H<sub>2</sub>O 5+95 aufgenommen. Die Kartuschen wurden mit 2 ml MeOH konditioniert und mit 2 ml Methanol+H<sub>2</sub>O 5+95 äquilibriert. Anschließend wurden 500 µl des rekonstituierten Extraktes auf die Kartusche gegeben, das Probengefäß mit 500 µl MeOH+H<sub>2</sub>O 5+95 gespült und diese Lösung ebenfalls auf die Kartusche gegeben. Es folgte ein Waschschritt mit 2 ml MeOH+H<sub>2</sub>O 5+95. Im nächsten Schritt wurde OQX mit 5 ml MeOH+H<sub>2</sub>O 1+4 von der Festphase eluiert, anschließend CBX mit 5 ml MeOH+H<sub>2</sub>O 1+1. Die Elutionsfraktionen wurden getrennt voneinander wie zuvor beschrieben für die Messung vorbereitet.

## 3.7 Untersuchung von Matrixeffekten

### 3.7.1 Pre und post extraction addition nach Matuszewski et al.

Entsprechend der von Matuszewski et al. beschriebenen Methode (siehe Kapitel 2.3.3) wurden zur Untersuchung des Einflusses der Extraktion von Kokzidiostatika aus Futtermitteln drei Standardreihen hergestellt. Da keine Abhängigkeit der Matrixeffekte von der Analytkonzentration im Bereich von 0,5 pg/µl bis 5 pg/µl (entsprechend 2 µg/kg bis 20 µg/kg) beobachtet wurde, erfolgten die beschriebenen pre- und post extraction addition Experimente bei einer Konzentrationsstufe (5 pg/µl entsprechend 20 µg/kg).

Zur Herstellung der Standardlösungen und der post extraction Matrixstandards wurden das erforderliche Volumen des Standardmix mit Lösungsmittel bzw. mit dem Extrakt einer Blankeiweiß-, Blankeigelb- oder Blankfuttermittelprobe versetzt. Diese Gemische wurden zur Trockne eingedampft. Für die pre extraction Matrixstandards wurden Blankmaterialien der drei Matrices mit 20 µg/kg dotiert und extrahiert. Ein Aliquot wurde zur Trockne eingedampft. Alle Rückstände wurden im Lösungsmittelgemisch mit der Startzusammensetzung des HPLC-Gradienten, aufgenommen, sodass eine Konzentration von 5 pg/µl in der Messlösung vorlag. Die pre- und post extraction addition erfolgte jeweils mit drei Wiederholungen. Aus den ermittelten Peakflächen wurden nach den Formeln (1-4) Wiederfindung, Matrixeffekt und Prozesseffizienz berechnet.

### 3.7.2 Postcolumn Infusion

Zur Erstellung der Matrixeffektprofile der Kokzidiostatika wurde eine Standardlösung von 1,375 pg/µl kontinuierlich mit einer Spritzenpumpe (Fa. Harvard) bzw. einer Hilfspumpe (Dionex P658) über ein T-Stück nach der Trennsäule in den HPLC-Fluss eingeleitet. Die Flussrate betrug 20 µl/min. Die Konzentration der Standardlösung wurde so berechnet, dass die absolute in der Ionisationsquelle vorliegenden Menge an Analyt

derselben Menge entsprach wie bei der Injektion der pre- und post extraction addition Standardlösungen in die HPLC.

Die Konzentration der PCI-Standardlösung von CBX und OQX betrug 0,275 µg/ml entsprechend der pre- und post extraction addition Konzentration von 1 µg/ml. Die LC-MS/MS-Methode wurde für die PCI-Messungen angepasst. Positiv und negativ ionisierte Substanzen wurden in zwei separaten Messungen analysiert. Zur Untersuchung einer bestimmten Blankmatrix wurden drei Messungen pro Ionisationsmodus durchgeführt. Nach zwei Messungen des reinen Extraktionsmittels wurde die Blankmatrix injiziert. Dies war notwendig, da Reste des injizierten Probenmaterials auf der Trennsäule zurückblieben und mindestens die nächste Lösungsmittelinjektion beeinflussten.

### Erzeugung der Matrixeffektprofile

Zur Auswertung dienten die Messung der Blankmatrix und die der vorhergehenden Lösungsmittelinjektion. Dazu wurden alle Messpunkte aus Retentionszeit und Peakfläche zunächst geglättet. Die geglättete Fläche zu Retentionszeit  $i$  ( $\text{Area}_{\text{geglättet}_i}$ ) wurde nach Formel 7 aus der Fläche zur Retentionszeit  $i$ , der Fläche zur Retentionszeit  $i-1$  und dem Glättungsfaktor  $f$  berechnet. Als Glättungsfaktor  $f$  wurde 0,7 verwendet.

$$\text{Area}_{\text{geglättet}_i} = (1 - f) \cdot \text{Area}_i + f \cdot \text{Area}_{i-1} \quad [142] \quad (6)$$

Anschließend wurde aus den geglätteten Flächen von Referenz- und Matrixmessung mithilfe der Formel (5) das Matrixeffektprofil berechnet. Für jede Kombination aus Probenmaterial, Lösungsmittel, Extraktionstechnik und Clean-up-Methode wurden mindestens drei Profile erstellt und daraus der Mittelwert gebildet.

## 3.8 Methodvalidierung

### 3.8.1 Bestimmung von Kokzidiostatika in Futtermitteln (Kontrolle der Höchstgehalte für Verschleppungen in Futtermittel für Nicht-Zieltierarten)

Die folgende Methode wurde zur Bestimmung von 11 Kokzidiostatika in Futtermittel im Konzentrationsbereich der Höchstgehalte (HG) für Verschleppungen in Futtermittel für Nicht-Zieltierarten validiert. Die Probe wird auf 1 mm-Partikelgröße gemahlen und durch Schütteln, z. B. im Überkopfschüttler, homogenisiert. Von der homogenisierten Probe werden 5 g in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss eingewogen. Interne Standardlösung wird in der Konzentration des Höchstgehaltes des entsprechenden Kokzidiostatikums mit einer Kolbenhubpipette hinzugegeben und durch kurzes Schütteln in der Probe verteilt. Zum Verdampfen des Lösungsmittels der Standardlösung wird die Probe ca. 10 min stehen gelassen. Anschließend werden 20 ml Acetonitril als Extraktionsmittel zugegeben, das Röhrchen verschlossen und eine Stunde im Überkopfschüttler extrahiert. Das Gemisch wird zentrifugiert und ein Aliquot des Rohextraktes entnommen. Dieses wird unter Stickstoffstrom im Thermoblock zur Trockene eingedampft, im gleichen Volumen Acetonitril-Wasser 3+7 (Anfangszusammensetzung des HPLC-Gradienten) aufgenommen und über 0,2 µm-Nylon-Filter zentrifugalfiltriert.

Die Parameter der LC-MS/MS-Methode sind im Anhang Kapitel 7.7.1 beschrieben. Aufgrund der unterschiedlichen Höchstgehalte der Kokzidiostatika weichen die Zielkonzentrationen der Methode für die einzelnen Analyten voneinander ab (bis Faktor 125). Deshalb wird eine Standardmischung der Analyten im Verhältnis ihrer Höchstgehalte (Tabelle 7) verwendet.

**Tabelle 6:** Konzentration der Analyten im Standard-Mix entsprechend der festgelegten Höchstgehalte (HG) im Futtermittel

Analyt	ng/µl im Standardmix	HG in µg/kg [8]	verwendeter IS
Ethopabat	20	-	-
Robenidin	28	700	Robenidin-d <sub>8</sub>
Nicarbazin	20	500	Dinitrocarbanilid-d <sub>8</sub> , Dinitrocarbanilid- <sup>13</sup> C <sub>12</sub>
Diclazuril	0,4	10	Diclazuril-bis
Semduramicin	10	250	Nigericin
Salinomycin	28	700	Nigericin
Narasin	28	700	Nigericin
Monensin	50	1250	Nigericin
Maduramicin	2	50	Nigericin
Lasalocid	50	1250	Nigericin
Decoquinat	16	400	Decoquinat-d <sub>5</sub>

Die Validierungsparameter Wiederfindung und Präzision wurden bei 80 %, 100 % und 110 % des jeweiligen Höchstgehaltes überprüft. Die Matrixkalibrierung zur Quantifizierung der Gehalte wurde in einem Arbeitsbereich von 25 % bis 160 % der Höchstgehalte angefertigt (Tabelle 8). In der Mischung (100 % HG) lag ein Konzentrationsbereich von 0,4 ng/µl (Diclazuril) bis 50 ng/µl (Monensin, Lasalocid) vor. Innerhalb einer Messung lagen daher nicht alle Kokzidiostatika in dem für die LC-MS/MS-Analyse optimalen Konzentrationsbereich. Gegebenenfalls wurden deshalb verschiedene Verdünnungen der Futtermittlextrakte hergestellt und gemessen.

### Überprüfung der Linearität des Arbeitsbereiches

Der Arbeitsbereich der Methode ist durch die Höchstgehalte vorgegeben, sodass die in Tabelle 7 beschriebene Kalibrierreihe verwendet wurde.

Um diesen Arbeitsbereich auf Linearität zu überprüfen, wurden die ermittelten Peakflächen und Peakflächenverhältnisse der Kalibrierstufen gegen die entsprechende Konzentration aufgetragen und die lineare sowie die quadratische Kalibrierfunktion berechnet. Neben dem Bestimmtheitsmaß war die Reststandardabweichung ein Kriterium zum Vergleich der Kalibrierfunktionen. Diese gibt die Abweichung der Messwerte von der berechneten Regressionsfunktion der Kalibrierreihe an.

**Tabelle 7:** Matrixkalibrierreihe - Konzentration der Kalibrierpunkte in % der Höchstgehalte (HG) und dafür auf Blankfuttermittel dotierte Volumina des Standard-Mixes

Bezeichnung	Konzentration der Kalibrierstufe in % des HG	auf 5 g Blankfuttermittel dotiertes Volumen des Standardmix
MK0	0	-
MK1	20	25 µl
MK2	40	50 µl
MK3	60	75 µl
MK4	80	100 µl
MK5	100	125 µl
MK6	120	150 µl
MK7	140	175 µl
MK8	160	200 µl
IS	80	100 µl IS-Mix

$$s_{y1} = \sqrt{\frac{\sum (y - \hat{y})^2}{n - 2}} \quad (7)$$

$$s_{y2} = \sqrt{\frac{\sum (y - \hat{y})^2}{n - 3}} \quad (8)$$

$$\hat{y} = a + b \cdot c \quad (9)$$

- $s_{y1}$  Reststandardabweichung der Funktion 1. Ordnung
- $s_{y2}$  Reststandardabweichung der Funktion 2. Ordnung
- $n$  Anzahl der Messungen
- $y$  Messwert des Analyt-Signals (Peakfläche bzw. Peakflächenverhältnis)
- $\hat{y}$  y-Werte der Kalibrierfunktion
- $c$  µg/kg Analyt in der Einwaage

Die Linearität wurde außerdem mit Hilfe des Mandel-Anpassungstests überprüft. Die Reststandardabweichungen der Kalibrierfunktionen wurden anhand der Formeln 7 – 9 berechnet. War die Reststandardabweichung der Funktion 1. Ordnung kleiner bzw. gleich der Funktion 2. Ordnung, so wurde der Kalibrierbereich als linear angesehen.

In der DIN 38402 Teil 51 [143] wird der Mandel-Anpassungstest zur Überprüfung der Linearität des Arbeitsbereiches vorgeschrieben. Dazu werden ebenfalls die Reststandardabweichungen der Kalibrierfunktionen 1. und 2. Ordnung verwendet. Aus diesen wird die Differenz der Varianzen DS2 berechnet und ein F-Test durchgeführt. DS2 und die Prüfgröße für den F-Test werden nach den Formeln (7), (8), (10) und (11) berechnet.

$$DS^2 = (n - 2) \cdot s_{y1} - (n - 3) \cdot s_{y2} \quad (10)$$

$$PG = \frac{DS^2}{s_{y2}} \quad (11)$$

Die Prüfgröße PG wird mit dem Tabellenwert F bei  $f_1=1$ ,  $f_2=n-3$  und 99 % Signifikanzniveau verglichen. Ist die Prüfgröße kleiner als der Tabellenwert, so ist die Anpassung durch die Kalibrierfunktion 2. Ordnung nicht signifikant besser als die Funktion 1. Ordnung und der Kalibrierbereich ist linear.

### Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurde die Kalibriergeradenmethode der DIN ISO 32645-1994 [144] verwendet. Der Berechnung der Nachweisgrenzen basierte auf einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % und die der Bestimmungsgrenze auf einer Ergebnisunsicherheit von 20 %. Abweichend von dieser Vorschrift wurden die Grenzen im Arbeitsbereich der Methode und nicht im Bereich der Nachweisgrenze bestimmt.

### Wiederfindung und Präzision

Zur Bestimmung der Wiederfindung und der Präzision der Methode unter Wiederholbedingungen wurde ein Blankfuttermittel in drei Konzentrationslevels (80 %, 100 % und 110 % des HG) jeweils im fünffach-Ansatz dotiert, aufgearbeitet und gemessen. Der Versuch wurde außerdem an einem weiteren Tag durchgeführt, um die Präzision unter Zwischenbedingungen zu bestimmen. Die Wiederfindungsraten (WFR) für alle Analyten wurden nach Formel (16) für die drei Dotierungen ermittelt.

$$WFR = \frac{c_{ist}}{c_{soll}} \cdot 100\% \quad (12)$$

$c_{ist}$     ermittelte Maduramicin-Konzentration  
 $c_{dot}$     dotierte Maduramicin-Konzentration

Als Maß für die Präzision unter Wiederholbedingungen wurden die Variationskoeffizienten zwischen zwei Tagen berechnet. Die Berechnung erfolgte aus dem Schätzwert der Standardabweichung (Formel (13)) der Mehrfachbestimmung eines Tages und dem dazugehörigen Mittelwert. Zur Berechnung des Variationskoeffizienten innerhalb eines Tages (Formel (14)) wurden der Mittelwert und der Schätzwert der Standardabweichung der Einzelergebnisse beider Messtage (Formel (13)) verwendet. [145]

$$s_c = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (c - \bar{c})^2}{n - 1}} \quad (13)$$



$$Var_{koeff} = \frac{s_c}{\bar{c}} \cdot 100\% \quad (14)$$

Die Präzision der Methode unter Zwischenbedingungen wurde anhand der in dotierten Proben ermittelten Konzentrationen nach fünffacher Aufarbeitung und Messung durch denselben Bearbeiter an zwei verschiedenen Tagen bestimmt. Die interday-Variationskoeffizienten wurden dazu aus den 10 Messwerten (je 5 Messungen pro Tag) pro Analyt und Konzentrationslevel berechnet und in Tabelle 13 aufgelistet. Die Ergebnisse wurden zusätzlich mittels F-Test daraufhin überprüft, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den ermittelten Gehalten an zwei verschiedenen Tagen besteht. Für diese einfaktorielle Varianzanalyse (analysis of variance - ANOVA) wurde die Prüfgröße F nach Formel (15) berechnet und mit dem kritischen F-Wert (Tabellenwert) für zwei Gruppen mit jeweils fünf Werten bei einem Signifikanzniveau von 5 % verglichen (s. Tabelle 13).

$$F = \frac{n_1 \cdot n_2 \cdot (\bar{c}_1 - \bar{c}_2)}{n_1 \cdot v_1 + n_2 \cdot v_2} \quad (15)$$

Der kritische F-Wert für den Vergleich von jeweils 5 Stichproben aus zwei Gruppen (einfaktorielle Varianzanalyse) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % beträgt 5,318. Ist die berechnete Prüfgröße F kleiner als der kritische F-Wert, ist der Unterschied zwischen beiden Gruppen nicht signifikant und die Methode ist präzise unter Zwischenbedingungen.

### **Robustheit der Methode – Einfluss des Bearbeiters**

Im Rahmen der Methodenvvalidierung wurde ebenfalls die Robustheit der Methode getestet. Dazu wurden dotierte Blankfuttermittel zusätzlich von einem zweiten Bearbeiter analysiert und die Ergebnisse beider Bearbeiter gegenübergestellt. Auch hier wurde mittels F-Test überprüft, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Datensätzen vorlag.

#### **3.8.2 Bestimmung von Maduramicin in Futtermittel, Eiweiß und Eigelb mittels LC-MS/MS zur Untersuchung des Carry-over**

Der zu validierende Konzentrationsbereich ergab sich aus den festgelegten Höchstgehalten für Maduramicin in Futtermittel durch RL 2009/8/EG und in Ei durch die VO (EG) Nr. 124/2009. Da drei Maduramicin-Gehalte bis zum festgelegten Höchstgehalt im Futtermittel in einem Fütterungsversuch untersucht werden sollten, wurde die Methode im Bereich von 10 µg/kg bis 50 µg/kg im Futtermittel validiert. Die Bestimmung der aus der Fütterung resultierenden Gehalte im Ei erfolgte zur Klärung weiterer Fragestellungen getrennt in Eiweiß und Eigelb. Dazu wurde die Methode im Bereich des Höchstgehaltes von 2 µg/kg und darunter (1 µg/kg) in Eiweiß bzw. Eigelb validiert.

Nach der Probeneinwaage (2 g für Eimatrices, 5 g für Futtermittel) wird diese mit dem internen Standard Nigericin versetzt und mit Acetonitril mit 1 % (v/v) Ameisensäure (4 ml für Eimatrices und 20 ml für Futtermittel) extrahiert. Eine Aliquot der Eigelbextrakte wird zur Aufreinigung über eine HybridSPE-Kartusche gegeben. Anschließend

werden Aliquote aller Extrakte vollständig eingedampft. Die Eimatrixextrakte werden in 1/10 des Volumens wieder aufgenommen (in Eluent), Futtermittelextrakte im gleichen Volumen. Diese Lösungen werden vor der LC-MS/MS-Analyse zentrifugalfiltriert.

Wie in Kapitel 3.8.1 wurden die folgenden Validierungsparameter für die Methode zur Bestimmung von Maduramicin in Futtermittel, Eiweiß und Eigelb ermittelt: Linearität des Arbeitsbereiches, Nachweis- und Bestimmungsgrenze, Wiederfindung, Präzision unter Wiederhol- und Zwischenbedingungen und Robustheit.

Zur Prüfung der Linearität des Arbeitsbereiches wurden Matrixkalibrierreihen für die drei zu untersuchenden Matrices hergestellt und gemessen. Für Eiweiß und Eigelb wurden 15 Maduramicin-Konzentrationen von 0–5 µg/kg dotiert, für Futtermittel 10 Level von 0 bis 100 µg/kg. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden unter Verwendung der Kalibriergeradenmethode der DIN 32645 ermittelt. Dafür wurden Matrixkalibriergeraden mit je 10 Konzentrationsstufen von 0–3,75 µg/kg für Eiweiß und Eigelb bzw. 0–15 µg/kg für Futtermittel hergestellt und gemessen. Zur Bestimmung der Wiederfindung und der Präzision der Methode unter Wiederhol- und Zwischenbedingungen wurden die Blankmatrices an zwei Tagen mit drei verschiedenen Konzentrationen dotiert und im Fünffach-Ansatz analysiert. Eiweiß und Eigelb wurden mit je 0,5 µg/kg, 1 µg/kg und 2 µg/kg aufgestockt, die Dotierungen im Futtermittel betrugen 25 µg/kg, 50 µg/kg und 75 µg/kg. Die Robustheit der Methode im Hinblick auf den Einfluss des Bearbeiters auf das Analyseergebnis wurde untersucht. Dazu wurden wie o. g. dotierte Eiweiß-, Eigelb- und Futtermittel-Blankmaterialien von zwei Bearbeitern jeweils im 5fach-Ansatz analysiert.

## 3.9 Durchführung der Carry-over-Studie

### 3.9.1 Voraussetzungen

Die Untersuchung des Transfers pharmakologisch wirksamer Substanzen aus dem Futtermittel in das Ei der Legehennen erfordert eine ausführliche Planung. Grundvoraussetzung für die Durchführung ist eine Genehmigung im Sinne des Tierschutzgesetzes durch die verantwortliche Behörde. In § 7 des Tierschutzgesetzes ist der Begriff Tierversuch definiert als „... Eingriff oder Behandlung... an Tieren... oder am Erbgut von Tieren...“, wenn sie mit Schmerzen, Leiden oder Schäden...“ [146] verbunden sein können. Außerdem sind die zur Durchführung von Tierversuchen berechtigenden Ziele und Zwecke festgelegt. Diese müssen für den konkreten Fall vorgelegt und geprüft werden. Der Antragsteller muss nachweisen, dass aufgrund des geplanten Versuches sinnvolle und statistisch abgesicherte Ergebnisse erzielt werden. Die Unterbringung und Pflege der Tiere muss ebenfalls gesichert sein.

Für einen Carry-over-Versuch müssen des Weiteren Methoden zur Quantifizierung des untersuchten Wirkstoffes sowohl im Futtermittel als auch im Hühnerei zur Verfügung stehen. Die Beschaffung der Futtermischung bzw. des Wirkstoffes und eines geeigneten Basisfutters zur Herstellung einer Mischung muss gesichert sein. Es müssen Möglichkeiten zur Homogenisierung und Kapazitäten zur Lagerung des belasteten Futtermittels und auch der erzeugten Eiprobe vorhanden sein. Vor Beginn des Versuches sollte die

Homogenität des Wirkstoffes im Futtermittel bestätigt sein bzw. entsprechende Maßnahmen oder Überlegungen getroffen werden, wie im Fall von Inhomogenität vorgegangen wird. Nach Abschluss des Versuches sollten der Verbleib der Tiere sowie die Entsorgung von Futtermittel- und Eiprobe geklärt und gewährleistet sein.

### 3.9.2 Herstellung und Homogenitätsprüfung der Futtermittelmischungen

Ist für die Fütterungsstudie kein belastetes Futtermittel, z.B. kontaminierte Proben aus der amtlichen Futtermittelüberwachung vorhanden, so muss dieses hergestellt werden. Zur Herstellung von Referenzmaterialien wurden verschiedene Protokolle entwickelt. Ein bekanntes Mischverfahren zur Herstellung von Referenzmaterial ist das Cross Riffing von van der Veen [147]. Ursprünglich für Steinkohleproben entwickelt, wird die Methode inzwischen für Referenzmaterialien verschiedenster Art verwendet. Durch die Teilung einer Hauptprobe und verschachtelte Rekombination der Teilproben untereinander wird eine effektive Mischung erzielt, welche auch durch mathematische Simulationen vorhergesagt werden kann.

Aufgrund der geringen Maduramicin-Zielkonzentrationen von 10–50 µg/kg im Futtermittel waren zwei Schritte zur Herstellung der Futtermittel für die Fütterungsstudie erforderlich. Das als Basis der Futtermittel dienende Alleinfutter für Legehennen (TÜK TÜK – Zusammensetzung siehe Tabelle 24) wurde zunächst auf Spuren von Maduramicin analysiert. Eine Kontamination wurde ausgeschlossen. Dann wurde im ersten Schritt aus dem kommerziell erhältlichen Maduramicin-Premix (Cygro® mit 1 % Maduramicin-Gehalt) und dem Maduramicin-freien Futter eine Vormischung mit 5 µm Maduramicin pro kg Futtermittel hergestellt. Diese wurde im zweiten Schritt mit dem Legehennenfutter auf die drei Zielkonzentrationen verdünnt und homogenisiert.

Die Prüfung auf Homogenität erfolgte entsprechend eines international anerkannten Protokolls der IUPAC. [148] Die Homogenität der Gesamtprobe wird durch die Analyse einer ausreichenden Anzahl von zufällig gezogenen Proben untersucht. Die statistische Auswertung der Daten erfolgt mittels einer Varianzanalyse, welche die Abweichung der ermittelten Wirkstoff-Konzentration zwischen den Mehrfachbestimmungen der Einzelproben den Abweichungen zwischen den verschiedenen Proben gegenüberstellt.

#### Maduramicin-Vormischung mit 5 mg/kg Futtermittel

Zur Herstellung der Vormischung wurden 3,2 g Maduramicin-Premix und 7 kg des Legehennenfutters eingewogen und zunächst in einem Pflugscharmischer für einige Minuten gemischt. Aufgrund der starken Zentrifugalkräfte bei dieser Mischtechnik ist eine längere Mischdauer nicht sinnvoll.

Zur Homogenitätsprüfung wurden 10 Proben à 50 g – 60 g zufällig entnommen und jede Probe mit Hilfe einer Messermühle vorzerkleinert und mit einer Schlagmühle mit 1 mm Sieb gemahlen. Anschließend wurden die gemahlenen Proben 2 Stunden im Überkopfschüttler gemischt und jede im Zweifach-Ansatz analysiert. Die einfaktorielle Varianzanalyse der ermittelten Maduramicin-Gehalte ergab, dass die Verteilung von Maduramicin in der Vormischung inhomogen war. Deshalb wurde die Vormischung erneut für

3 Stunden in einem Rhönradmischer, gemischt. Anschließend wurden wieder 10 Proben entnommen, gemahlen und auf Homogenität geprüft. Die Ergebnisse der Homogenitätsprüfung sind im Abschnitt 5.2.2 in Tabelle 25 dargestellt.

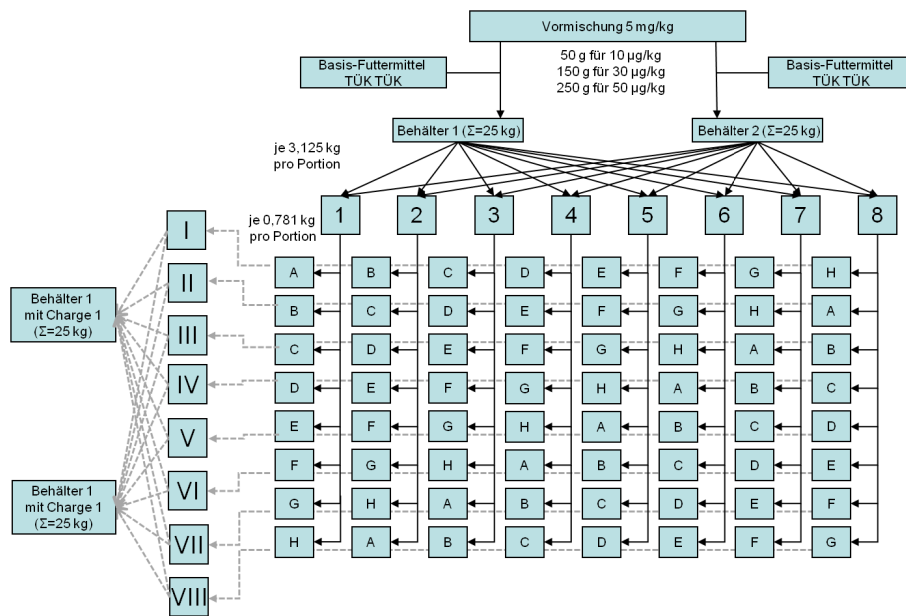
#### **10 µg/kg-, 30 µg/kg- und 50 µg/kg Maduramicin-Futtermittel**

Mit dem Rhönradmischer war das Mischen von 25 kg Futtermittel möglich. Jedes der unterschiedlich konzentrierten Futtermittel wurde deshalb in zwei Portionen hergestellt und im Rhönradmischer homogenisiert. Für die Herstellung und Homogenisierung der verschieden konzentrierten Futtermittelmischungen wurde das Cross Riffing Verfahren angewendet. Van der Veen [147] beschrieb diese Methode unter Verwendung eines Probenteilers. Bei dem vorliegenden Futtermittel wäre die Nutzung eines Probenteilers in Kombination mit einer Vibrationstransportrinne ungünstig, da das Gemisch durch die Zusammensetzung aus Getreidekörnern, Schrot und Staub in sich sehr heterogen war. Ein gleichmäßiger Transport wäre über eine Vibrationsrinne nicht oder nur schwer möglich. Aus diesem Grund wurde das Cross Riffing durch Schaufeln oder Schöpfen mit einer glasierten Keramikschale durchgeführt.

Zunächst wurde die benötigte Futtermittelmenge pro Fütterungsversuch berechnet. Bei einer Tagesration von 120 g Futter pro Huhn, 10 Tieren pro Gruppe waren für 21 Versuchstage knapp 26 kg Futtermischung erforderlich. Zusätzlich mussten Proben für die Homogenitätsprüfung im Rahmen der Herstellung, sowie tägliche Qualitätsproben während des Versuches berücksichtigt werden. Mit einer großen Sicherheitsspanne wurden deshalb von jeder Futtermischung 50 kg hergestellt. Zur Homogenisierung im Rhönradmischer standen Kunststofffässer à 56 Liter zur Verfügung. Um eine ausreichende Durchmischung innerhalb eines Fasses zu gewährleisten, wurden pro Maduramicin-Konzentration zwei Chargen à 25 kg hergestellt.

Im ersten Schritt wurden 50 g, 150 g bzw. 250 g der Vormischung (5 mg/kg Maduramicin) für die Herstellung von jeweils 25 kg Futtermittel mit 10 µg/kg, 30 µg/kg und 50 µg/kg Maduramicin eingewogen. Pro Maduramicin-Konzentration im Futtermittel wurden zwei Chargen à 25 kg Futtermittel hergestellt. Die eingewogene Menge der Vormischung wurde jeweils in 56-Liter-Fässern in 25 kg des Basisfutters TÜK TÜK eingemischt und jede Tonne für zwei Stunden im Rhönradmischer geschüttelt.

Die zwei Grobmischungen von je 25 kg wurden auf acht 15-Liter-Fässer verteilt, indem jeweils ein Achtel aus beiden Mischungen vereinigt wurden. Dies erfolgte in entgegengesetzter Reihenfolge, sodass Teil 1 von Grobmischung 1 mit Teil 8 von Grobmischung 2 gemischt wurde. Die acht Teilmischungen wurden jeweils eine Stunde im Rhönradmischer homogenisiert. Darauf folgte das eigentliche Cross Riffing Verfahren. Nach dem Schema in Abbildung 16 wurde der Inhalt aller acht Fässer erneut auf acht Fässer aufgeteilt und wiederum eine Stunde lang im Rhönradmischer gemischt. Schließlich wurden die acht Teilmischungen jeweils halbiert und abwechselnd auf die beiden finalen Chargen aufgeteilt, welche nochmals für zwei Stunden homogenisiert wurden.



**Abbildung 16:** Cross Riffing Verfahren zur Homogenisierung der Futtermittel

Jeweils beide Chargen der Futtermittel mit 10 µg/kg, 30 µg/kg und 50 µg/kg Maduramicin wurden anhand von zehn, mit Hilfe eines Probenstechers zufällig entnommen, Proben auf die homogene Verteilung des Kokzidiostatikums untersucht. Jede Probe wurde zweifach analysiert und eine Varianzanalyse der ermittelten Gehalte durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abschnitt 5.2.2 dargestellt.

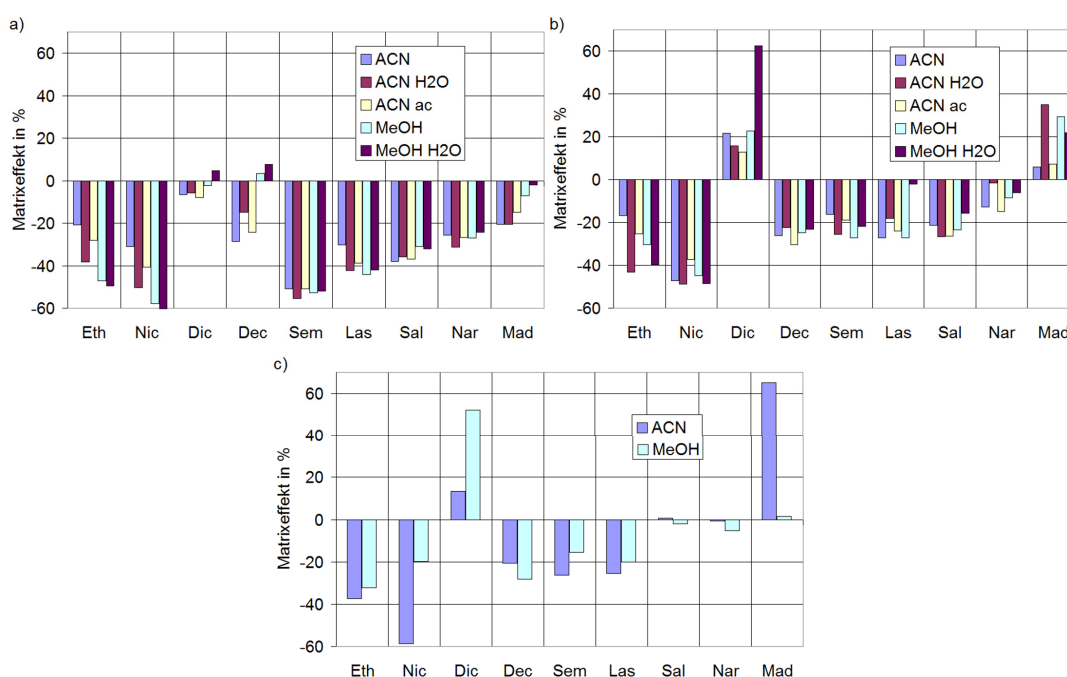
## 4 Ergebnisse und Diskussion - Matrixeffekte

### 4.1 Endogene Matrixeffekte

#### 4.1.1 Einfluss der Extraktionstechnik und Extraktionslösungsmittel am Beispiel der Extraktion von Futtermitteln

##### Multimethode – Extraktion von Futtermittel

Die Extraktion ist ein entscheidender Faktor für die Ausprägung des beobachteten Matrixeffektes, da in diesem Schritt Störkomponenten aus der Probe gelöst werden. Sowohl die Extraktionskraft des Lösungsmittels als auch die Intensität der Extraktionstechnik sind dabei von Bedeutung. Im Folgenden werden mittels post extraction addition und PCI in Abhängigkeit von der Extraktion ermittelte Matrixeffekte beschrieben.

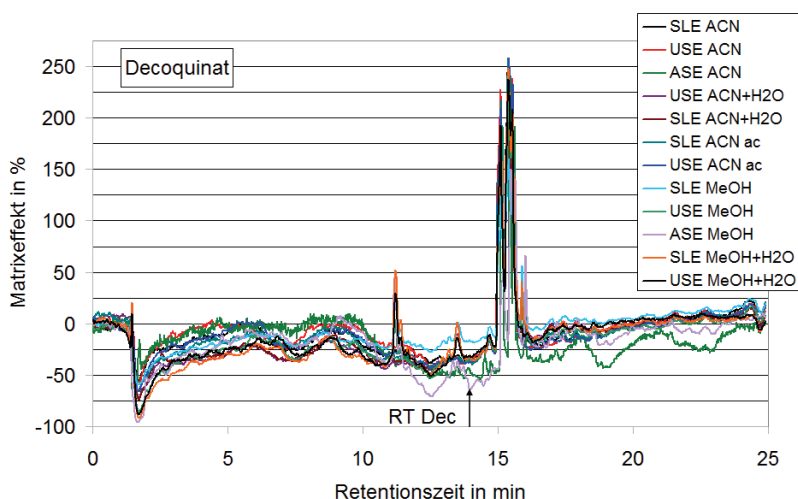


**Abbildung 17:** Matrixeffekte verschiedener Futtermittelextrakte auf Kokzidiostatika – Vergleich verschiedener Lösungsmittel zur Extraktion im Überkopfschüttler (a), im Ultraschallbad (b) und mit ASE (c)

Für die Extraktion von Futtermittelproben wurden ausführliche Matrixeffektuntersuchungen durchgeführt. Abbildung 17 zeigt die Matrixeffekte, welche bei der Schüttel-extraktion, Ultraschall-extraktion und ASE mit verschiedenen Lösungsmitteln auftreten. Die Ergebnisse für Monensin wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt, da Signalverstärkungen von mehreren Hundert Prozent (bis > 1000 %) vorlagen.

Für den Hauptteil der Analyten wurde, wie auch in der Literatur [119,149,150] beschrieben, ein negativer Matrixeffekt beobachtet. Beim Vergleich der Extraktionslösungs-

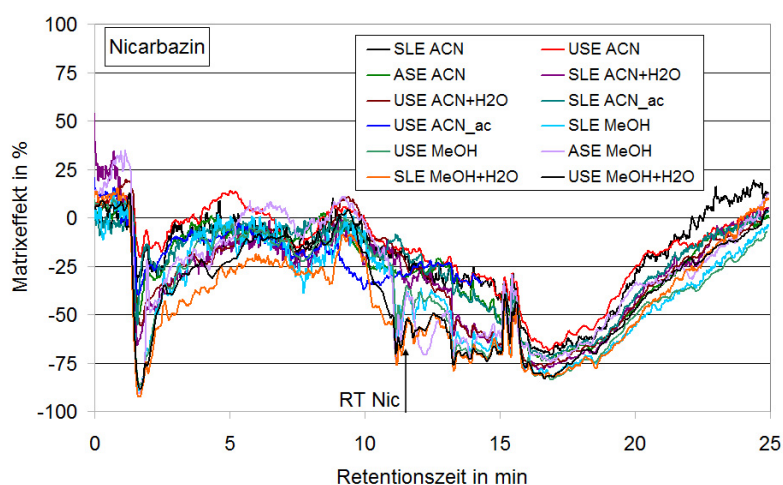
mittel für die Einzelsubstanzen waren mit der gleichen Extraktionstechnik jeweils ähnliche Effekte zu beobachten. Je nach verwendeter Extraktionsmethode war der ermittelte Matrixeffekt unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Lösungsmittel unterschieden sich nur geringfügig in ihrer Polarität, weshalb der Einfluss des Lösungsmittels hier kleiner war als der der Extraktionsmethode. Die Verwendung von Lösungsmitteln mit geringerer Polarität hätten geringere Extraktionsausbeuten zur Folge, während unpolare Lösungsmittel höhere Mengen von unpolaren Matrixbestandteilen verfügbar machen würden. Dazu zählen auch Lipide, welche als ein Auslöser für Ionensuppression in der LC-MS/MS verantwortlich gemacht werden [125]. Für Maduramicin traten bei verschiedenen Extraktionstechniken gegensätzliche Matrixeffekte auf. Bei der Schüttelextraktion lag eine Signalunterdrückung, bei Ultraschallextraktion und ASE hingegen eine Signalverstärkung vor. Eine mögliche Hypothese zur Erklärung der unterschiedlichen Matrixeffekte ist die Zersetzung von Matrixbestandteilen unter den extremeren Extraktionsbedingungen unter Freisetzung von signalverstärkenden Bruchstücken aus vorher zur Signalsuppression führenden Molekülen. Auffällig war außerdem, dass die Unterdrückung der Signale der ionophoren Kokzidiostatika bei der Schüttelextraktion mit zunehmender Retentionszeit der Analyten abnahm (Abbildung 17 a). Mit den anderen Extraktionstechniken war der Effekt weniger deutlich. Die beiden in der Literatur häufig beschriebenen organischen Lösungsmittel Acetonitril und Methanol wurden in reiner Form, mit Zusatz von 10 % Wasser und Acetonitril außerdem mit 1 % Essigsäure zur Extraktion von Futtermittelproben verwendet. Die wasserhaltigen Extraktionslösungen führten im Allgemeinen zu einer leichten Verstärkung des Matrixeffektes gegenüber dem reinen Lösungsmittel. Durch den Wasseranteil konnten also größere Mengen interferierender Matrixbestandteile, mit offenbar polaren Eigenschaften, extrahiert werden. Der Zusatz von Essigsäure zum Acetonitril hatte keinen deutlichen Effekt im Vergleich zum säurefreien Lösungsmittel.



**Abbildung 18:** Matrixeffektprofile von Decoquinat in Futtermittelextrakten verschiedener Extraktionstechniken und -lösungsmittel

Der Einfluss der Extraktion wurde auch mittels PCI untersucht. In Abbildung 18 und Abbildung 19 sind die Matrixeffektprofile eines mit verschiedenen Lösungsmitteln und Techniken (siehe Tabelle 3) extrahierten Legehennenfutters anhand der Analyten Decoquinat und Nicarbazin dargestellt. Dabei steht Decoquinat als Beispiel für die positiv ionisierten Substanzen und Nicarbazin für die negativ ionisierten Substanzen.

Im Allgemeinen sind die Matrixeffektprofile für eine Substanz in einer Matrix ähnlich, geringe Unterschiede ergeben sich durch die Variation von Extraktionslösungsmittel und -technik. Auffällig war der Bereich von der 2. bis zur 4. Minute des HPLC-Laufes, der durch starke Signalsuppression von 56 bis 93 % geprägt war. Bis zur 10. Minute liegt ausschließlich eine leichte Suppression vor, die im Bereich des Acetonitril-Plateaus des Gradienten (10 min bis 15 Minuten) etwas zunimmt. Bei der Extraktion mit Methanol und Methanol-Wasser treten zusätzlich zwei im Profil peakartig hervortretenden Bereichen der Signalverstärkungen auf. In den folgenden zwei Minuten des Laufes, in denen der Acetonitril-Anteil des Gradienten von 100 % auf 30 % reduziert wird, liegt für das Decoquinat-Signal bei allen Extraktionslösungsmitteln eine starke Erhöhung von 100 % bis zu 260 % in Form von zwei aufeinander folgenden Matrixeffektpeaks vor. Die zur Verstärkung führenden Substanzen müssen in diesem engen Retentionsbereich eluieren. Daraus könnte z.B. geschlossen werden, dass es sich um zwei einzelne Substanzen bzw. wenige verwandte Substanzen handelt, welche die Signalverstärkung verursachen. In der zweiten Hälfte der Messung der ASE-Extrakte wird das Decoquinat-Signal nochmals leicht unterdrückt.



**Abbildung 19:** Matrixeffektprofile von Nicarbazin in Futtermittlextrakten verschiedener Extraktionstechniken und -lösungsmittel

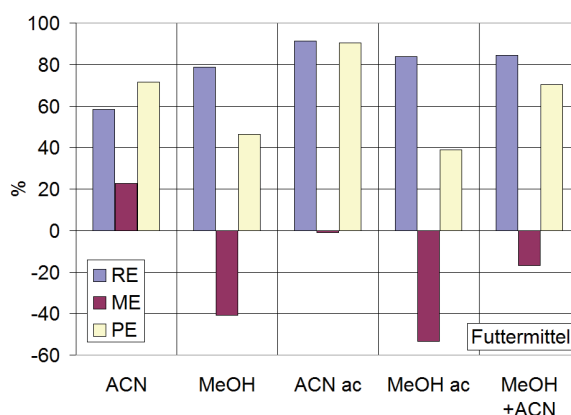
Im Gegensatz zu Decoquinat trat bei Nicarbazin fast ausschließlich Signalunterdrückung auf (Abbildung 19). Die Ausprägung der Matrixeffekte unterscheidet sich bei diesem Analyten stärker in Abhängigkeit von Extraktionslösungsmittel und -technik. Der Verlauf der Matrixeffektprofile ist jedoch ähnlich. Der Suppressionsbereich zu Beginn der



Messung ähnelt dem bei Decoquinat. Auch bis zur 10. Minute sind die Matrixeffektprofile der beiden Analyten vergleichbar. Danach nimmt der Matrixeffekt auf das Nicarbazin-Signal bis  $-80\%$  zu, um dann bis zum Ende der Messung wieder auf  $0\%$  Matrixeffekt zurückzugehen.

### Maduramicin-Einzelmethode

Im Rahmen der Entwicklung der Nachweismethode für Maduramicin in Eiweiß, Eigelb und Futtermittel wurden die fünf Extraktionsmittel getestet. Entsprechende pre- und post extraction addition Versuche wurden durchgeführt um die Wiederfindungsraten, Matrixeffekte und Prozesseffizienzen jedes Lösungsmittels in den drei Matrices zu ermitteln.



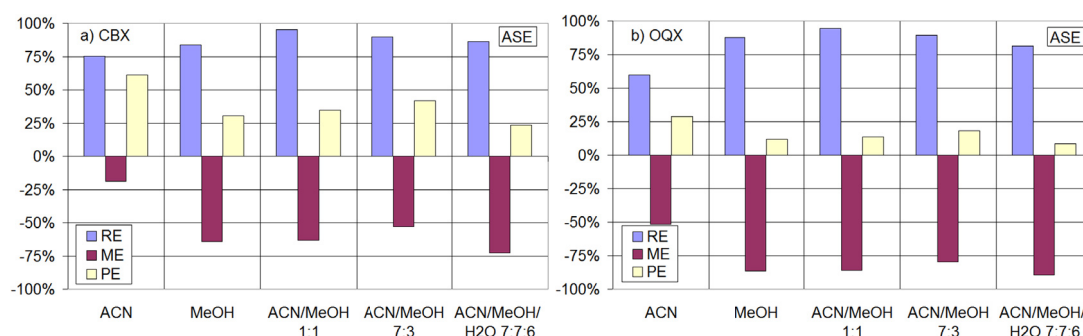
**Abbildung 20:** Vergleich verschiedener Lösungsmittel zur Schüttelextraktion von Maduramicin aus Futtermittel anhand von Wiederfindung (RE), Matrixeffekt (ME) und Prozesseffizienz (PE)

Abbildung 20 zeigt die Resultate für die Extraktion von Futtermittel. Die Wiederfindungsraten von Maduramicin aus dotiertem Futtermittel betragen  $59\%$  (mit ACN) bis  $90\%$  (mit ACN +  $2\%$  Ameisensäure). Sowohl Signalsuppression um bis zu  $55\%$  (mit MeOH +  $2\%$  Ameisensäure), als auch Signalverstärkung um  $22\%$  (mit ACN) wurden beobachtet. Das optimale Extraktionslösungsmittel ist hier ACN mit Ameisensäure. Im Vergleich zur Kokzidiostatika-Multimethode (Abbildung 17 a) ist unter diesen Extraktionsbedingungen ein geringerer Matrixeffekt zu verzeichnen, was auf die spezifischeren chromatographischen Bedingungen der Einzelmethode zurückzuführen sein könnte.

Keines der Lösungsmittel erwies sich für die Extraktion von Maduramicin aus allen Matrices gleichermaßen gut geeignet. Da für die Maduramicin-Einzelmethode möglichst geringe Variationen für die Analyse der verschiedenen Matrices angestrebt wurden, wurde das Lösungsmittelgemisch aus Acetonitril und Ameisensäure als Kompromiss für alle Matrices gewählt. In Eiweiß und Futtermittel führte das Gemisch zu vernachlässigbaren Matrixeffekten und im Eigelb zu einer verhältnismäßig geringen Signalverstärkung von  $40\%$  (gegenüber  $220\%$  und  $300\%$  mit reinem ACN bzw. MeOH). Prozesseffizienzen zwischen  $56\%$  und  $92\%$  waren ebenfalls akzeptabel.

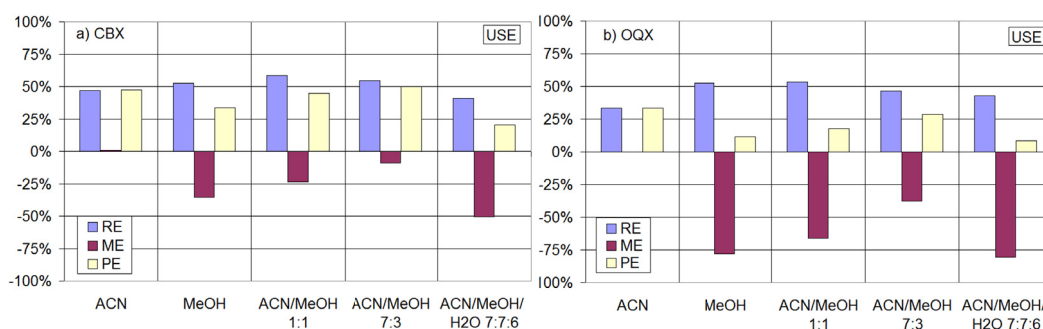
### CBX und OQX

Für die Extraktion von CBX und OQX aus Futtermitteln wurden sowohl ASE als auch USE mit verschiedenen Extraktionslösungsmitteln getestet. Mittels pre- und post extraction addition wurden Wiederfindung, Matrixeffekte und Prozesseffizienz bestimmt. Die Ergebnisse sind anhand ausgewählter Lösungsmittel in Abbildung 21 (für ASE) und in Abbildung 22 (für USE) dargestellt. Unter Verwendung der ASE wurden Wiederfindungsraten von 75 % (mit ACN) bis 92 % (mit ACN/MeOH 1:1) für CBX und 60 % (mit ACN) bis 95 % (mit ACN/MeOH 1:1) für OQX erzielt. Die Matrixeffekte waren für OQX (bis zu – 89 %) stärker ausgeprägt als für CBX (bis zu – 73 %). Bei der Extraktion mit ACN traten jeweils die niedrigsten Matrixeffekte auf.



**Abbildung 21:** Vergleich verschiedener Lösungsmittel für die ASE von CBX (a) und OQX (b) aus Futtermittel anhand von Wiederfindung (RE), Matrixeffekt (ME) und Prozesseffizienz (PE)

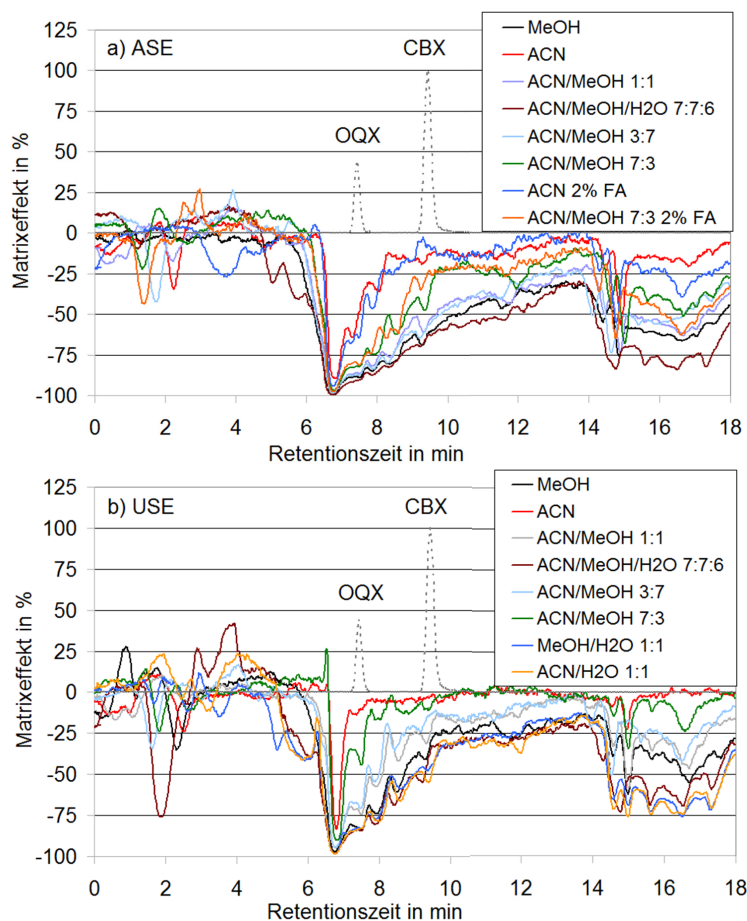
Mit der USE war die Wiederfindung deutlich schlechter als mit der ASE. Die höchsten Wiederfindungsraten betrugen 58 % (CBX) bzw. 53 % (OQX) bei der Verwendung von ACN/MeOH 1:1. Bis zu 50 % (CBX) bzw. 80 % (OQX) Signalsuppression trat auf, die stärksten Matrixeffekte jeweils mit ACN/MeOH/H2O 7:7:6. Bei der Extraktion mit reinem ACN war für beide Analyten kein Matrixeffekt zu beobachten.



**Abbildung 22:** Vergleich verschiedener Lösungsmittel für die Ultraschallextraktion (USE) von CBX (a) und OQX (b) aus Futtermittel anhand von Wiederfindung (RE), Matrixeffekt (ME) und Prozesseffizienz (PE)

Insgesamt erwies sich die ASE mit ACN als Kompromiss für beide Analyten mit minimalem Matrixeffekt bei akzeptabler Wiederfindung als beste Extraktionsvariante. Es wurde weiterhin getestet, ob die Zugabe von 2 % Ameisensäure zu den Extraktionsmitteln ACN und ACN/MeOH 7:3 eine zusätzliche Reduktion des Matrixeffektes bewirkt. Sowohl mit der post extraction addition als auch mit der PCI konnte kein signifikanter Rückgang des Matrixeffektes durch den Säurezusatz nachgewiesen werden.

Die Futtermittelextrakte aus den Extraktionstests für ASE und USE wurden mittels PCI untersucht, die Matrixeffektprofile sind in Abbildung 23 dargestellt.



**Abbildung 23:** Matrixeffektprofile für CBX in Futtermittelextrakten - Vergleich verschiedener Lösungsmittel für die ASE (a) und Ultraschallextraktion (USE) (b)

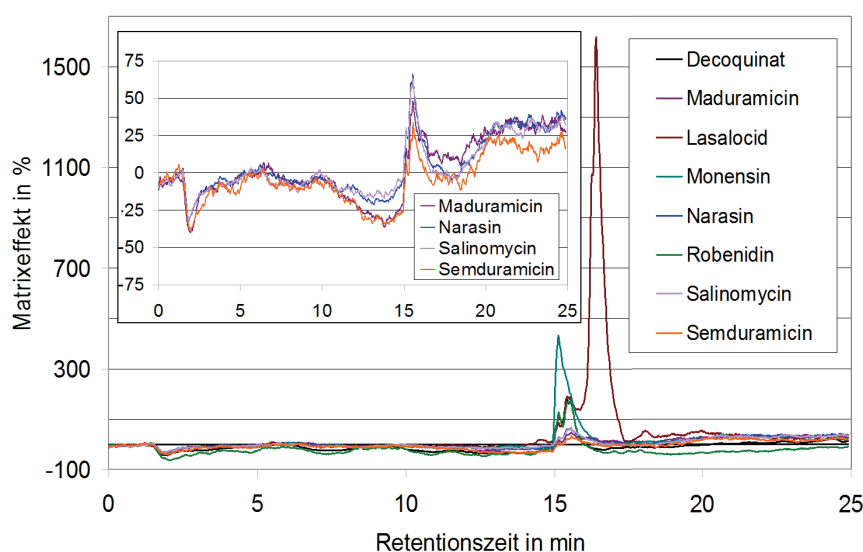
Im Retentionsbereich ab etwa 5 min verlaufen auch die Matrixeffektprofile von CBX in den AS- und US-Extrakten ähnlich, wie es auch beim Vergleich der Extraktionstechniken und -lösungsmittel für Kokzidiostatika beobachtet wurde. Bei beiden Extraktionstechniken ist mit dem Lösungsmittel ACN der Hauptsignaleinbruch ab ca. 7 min am schwächsten ausgeprägt. Unter Verwendung von MeOH oder Lösungsmittelgemischen mit Wasser (ACN/MeOH/H<sub>2</sub>O 35:35:30, ACN/H<sub>2</sub>O 1:1 und MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1) ist der Signaleinbruch

am stärksten. Ein abweichender Verlauf der Matrixeffektprofile ist in den ersten 5 min des chromatografischen Laufes zu beobachten. Besonders auffällig ist dies unter Verwendung des Lösungsmittelgemisches aus ACN, MeOH und Wasser. Bei der Extraktion im Ultraschallbad tritt einen deutlichen Signaleinbruch (bei 2 min) und darauf folgend ein Bereich der Verstärkung auf, während im AS-Extrakt in diesem Retentionsbereich kaum Einfluss auf das CBX-Signal zu beobachten ist. Es ist zu vermuten, dass die Wirkung des Ultraschalls zur Freisetzung zusätzlicher störender Substanzen führte, evtl. durch Abspaltung grenzflächenaktiver Bruchstücke aus größeren Verbindungen. Dabei könnte es sich beispielsweise um Aminosäuren oder Peptide handeln, die aus Proteinen freigesetzt wurden.

Die mit der post extraction addition ermittelten Matrixeffekte wurden durch die zur Retentionszeit der Analyten im Matrixeffektprofil vorliegenden Werte bestätigt.

#### 4.1.2 Einfluss des Analyten

Die gewählten Lösungsmittel weisen ein ähnliches Extraktionsvermögen für störende Substanzen auf. Der Verlauf des Matrixeffektprofils wird stärker von den Analyteigenschaften beeinflusst als von denen des Extraktionslösungsmittels.

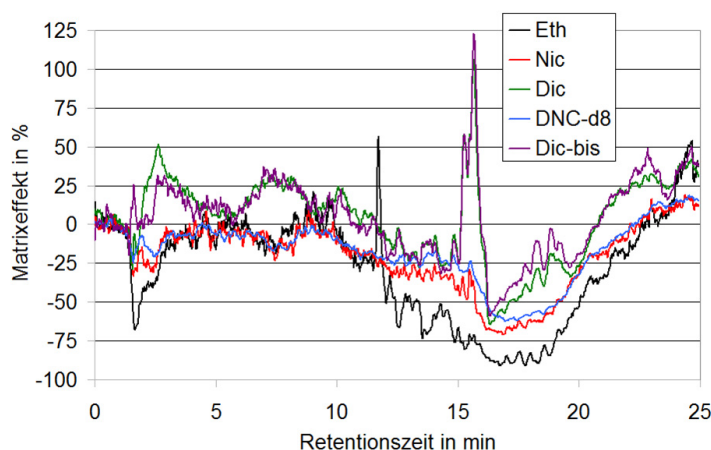


**Abbildung 24:** Matrixeffektprofile der positiv ionisierten Kokzidiostatika in Futtermittlextrakt (SLE mit Acetonitril), zweite Skalierungen für schwächer beeinflusste Analyten

Dies zeigt der Vergleich der Matrixeffektprofile aller positiv ionisierter Kokzidiostatika in Futtermittel nach SLE mit Acetonitril in Abbildung 24. Die im positiven Modus analysierten chemischen Kokzidiostatika Decoquinat und Robenidin zeigen sehr ähnliche Matrixeffektprofile, ebenso die ionophoren Kokzidiostatika Maduramicin, Narasin, Salinomycin und Semduramicin. Bei Letzteren treten maximal 40 % Signalsuppression und

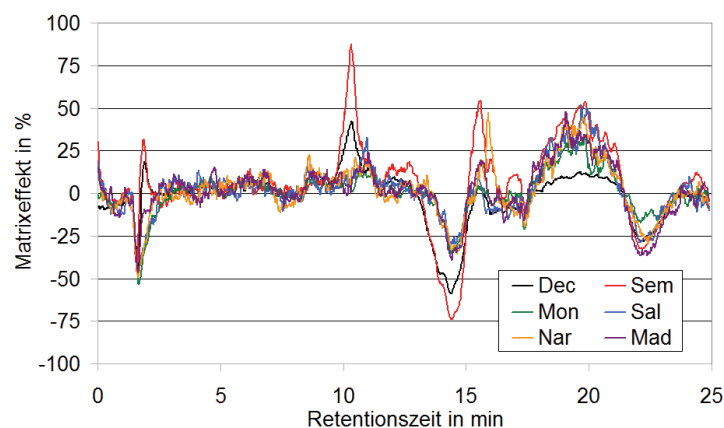
33 % bis 66 % Signalverstärkung auf. Lasalocid und Monensin weisen dagegen extreme Matrixeffektprofile auf. Auffällig ist der Retentionsbereich von 15 bis 17 Minuten, in welchem das Lasalocid-Signal um ca. 1600 % verstärkt wird, das Signal von Monensin um ca. 420 %. Aufgrund des HPLC-Gradienten eluieren zu dieser Retentionszeit die unpolarsten Substanzen. Warum die Signalverstärkung gerade bei Lasalocid und Monensin so stark ausgeprägt ist, ist unklar. Der Mechanismus der Signalverstärkung durch Erhöhung der Ionisationsrate (Ionenhancement) ist bisher noch weniger verstanden als die Mechanismen der Ionensuppression [131].

Während die Größenordnung der Matrixeffekte auf die positiv ionisierten Analyten variiert, werden für die negativ ionisierten Analyten und internen Standardsubstanzen ähnlich starke Matrixeffekte beobachtet (Abbildung 25). Die Matrixeffektprofile haben ähnliche Verläufe. Die Profile von Diclazuril und Diclazuril-bis weisen im Bereich von 15 bis 17 Minuten eine Signalverstärkung von bis zu 125 % auf.



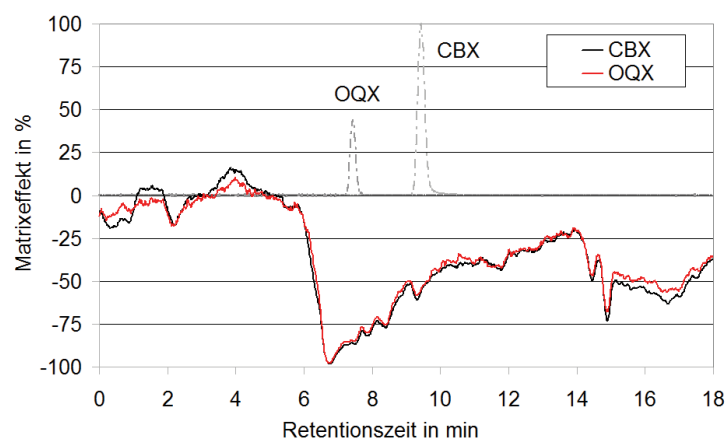
**Abbildung 25:** Matrixeffektprofile der negativ ionisierten Analyten und internen Standards in Futtermittel-extrakt (SLE mit Acetonitril)

Die positiv ionisierten Kokzidiostatika weisen ähnlich verlaufende Matrixeffektprofile in dem gleichen Probenmaterial auf, Abbildung 26 zeigt als Beispiel Gesamtei. Es liegt kein Unterschied zwischen dem chemischen Kokzidiostatikum Decoquinat und den Ionophoren vor. Suppression bzw. Verstärkung treten zur gleichen Retentionszeit auf und sind in Abhängigkeit vom Analyten unterschiedlich stark ausgeprägt.



**Abbildung 26:** Matrixeffektprofile ausgewählter Kokzidiostatika in Gesamteiextrakt (Extraktion mit Acetonitril mit 2 % Ameisensäure)

Bei der Betrachtung der Matrixeffektprofile von CBX und OQX in Futtermittel nach ASE (Extraktionslösungsmittel: Acetonitril/Methanol 1:1) in Abbildung 27 wird deutlich, dass sich die Matrix fast identisch auf beide Analyten auswirkt. Dies ist auf die starke Ähnlichkeit der der Substanzen in ihrer Struktur zu zurückzuführen. Die Darstellung der Matrixeffektprofile erfolgte deshalb jeweils nur am Beispiel von CBX.

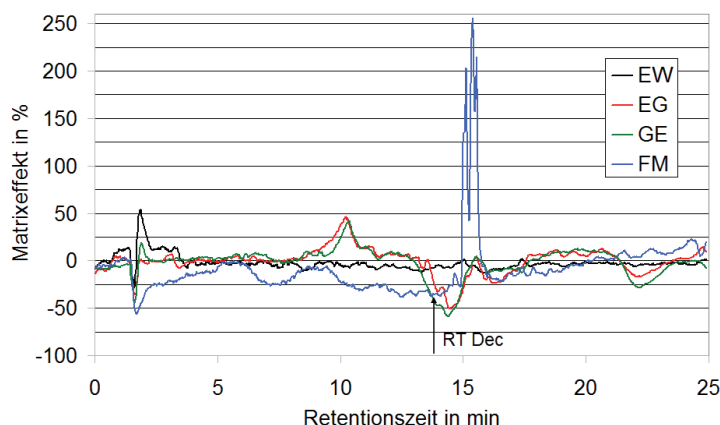


**Abbildung 27:** Matrixeffektprofile von CBX und OQX in Futtermittlextrakt (ASE mit Acetonitril/Methanol 1:1)

### 4.1.3 Einfluss von Art und Zustand der Matrix

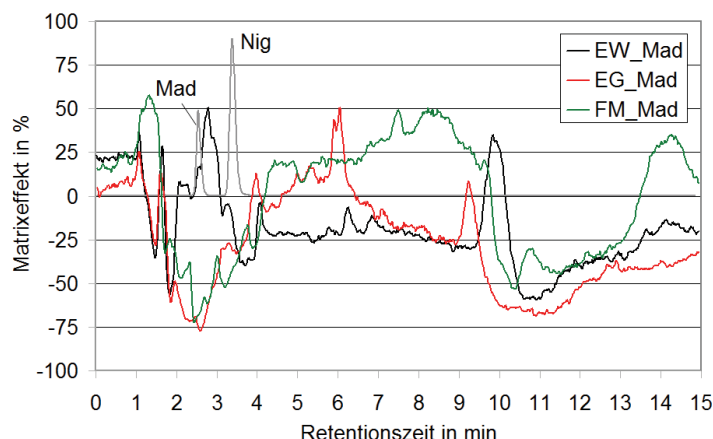
#### Matrixeffekte in Eiweiß, Eigelb und Gesamtei im Vergleich zum Futtermittel

SLE oder USE mit Acetonitril ist die in der Literatur am häufigsten verwendete Methode zur Extraktion von Kokzidiostatika aus Eiprobe. Matrixeffekte bei der Anwendung der Kokzidiostatika Multimethode für Eiprobe wurden daher anhand der Acetonitril-Extrakte untersucht. Mit der post extraction addition wurden Matrixeffekte in Eiweiß (Abbildung 37 a) von 50 % bei Decoquinat bis zu 60 % bei Monensin bestimmt. Ähnliche Werte ergaben sich für die Matrix Gesamtei (siehe Abbildung 37 b). Die Gegenüberstellung der Matrixeffektprofile von Decoquinat in Abbildung 28 zeigt deutliche Unterschiede zwischen den Profilen in Eiweiß, Eigelb und Gesamtei und dem Matrixeffektprofil in Futtermittel.



**Abbildung 28:** Matrixeffektprofile von Decoquinat in Eiweiß-, Eigelb-, Gesamtei- und Futtermittel-Extrakt (Extraktion mit Acetonitril mit 2 % Ameisensäure)

Die Profile in Eiweiß und Eigelb sind erwartungsgemäß verschieden, während die Matrices Eigelb und Gesamtei zu ähnlichen Matrixeffektprofilen für Decoquinat führen. Das Matrixeffektprofil des Eiweißextraktes zeigt nur im Retentionszeitbereich von 0 bis 4 min deutliche Effekte. Bei Eigelb und Gesamtei liegen sowohl Bereiche der Signalsuppression um 14 min Retentionszeit als auch der Signalverstärkung bei ca. 10 min liegen vor. Zur Retentionszeit von Decoquinat beträgt der Matrixeffekt im Profil etwa 50 % in Gesamtei, jedoch nur 25 % in Eigelb. Der Signaleinbruch war im Eigelb weniger stark ausgeprägt. Abbildung 29 zeigt die mit der Einzelmethode auftretenden Matrixeffektprofile von Maduramicin in Eiweiß, Eigelb und Futtermittel.



**Abbildung 29:** Matrixeffektprofile von Maduramicin in Eiweiß-, Eigelb- und Futtermittel-extrakt (Extraktion mit Acetonitril mit 2 % Ameisensäure)

Im Retentionszeitbereich von Maduramicin und Nigericin unterscheidet sich das Matrixeffektprofil in Eiweiß deutlich von denen in Eigelb und Futtermittel, die relativ ähnlich verlaufen. Im mittleren Teil des HPLC-Laufes unterschieden sich alle Profile voneinander, um im letzten Teil wieder ähnlich zu verlaufen. Daraus lässt sich ableiten, dass ähnliche Matrixbestandteile von Eigelb und Futtermittel, z. B. aus der Fettfraktion, für die Signalsuppression im ersten Drittel der Messung verantwortlich sein könnten. Gleiches gilt für alle drei Matrices im Retentionsbereich ab 10 Minuten. Der polarere Anteil der Matrixkomponenten von Eiweiß, Eigelb und Futtermittel, welcher im Bereich von 4 bis 10 Minuten bei einem Wasseranteil des Fließmittels von 50 % eluiert, unterscheidet sich nach dieser Hypothese.

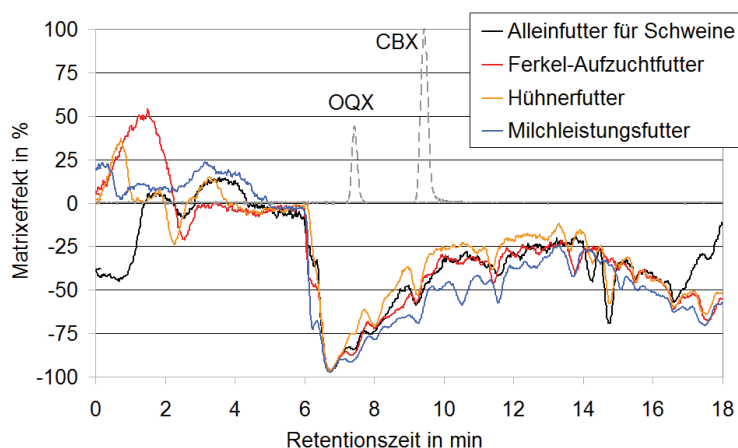
### Matrixeffekte verschiedener Futtermittel

Die Zusammensetzung des Probenmaterials ist ein entscheidender Einflussfaktor für den Matrixeffekt. Für die quantitative Bestimmung von Substanzen in komplexen Matrices wie Futtermittel ist deshalb die Auswahl eines geeigneten Blankmaterials für die Matrixkalibrierung sehr wichtig. Trotzdem ist es nicht praktikabel, von der Fülle an verschiedenen Futtermitteln für jede Probe ein entsprechend zusammengesetztes Blindwertfuttermittel zu verwenden. Deshalb wurde geprüft, wie sich die Matrixeffekte verschiedener Futtermittel auf die 11 als Futtermittelzusatzstoffe zugelassenen Kokzidiostatika unterscheiden. Die Extrakte (SLE mit Acetonitril, dSPE PSA C18) eines Alleinfuttermittels für Legehennen und eines Futtermittels für Masthühner wurden mit der post extraction addition untersucht. Die Matrixeffekte der beiden Futtermittel auf die Kokzidiostatika unterschieden sich im Durchschnitt um 5 %-10 % (max. um 20 %), das Masthühnerfutter die stärkere Signalsuppression verursachte.

Auch für die quantitative Analyse von CBX und OQX in Futtermitteln ist eine Matrixkalibrierung unerlässlich. Um zu prüfen, wie sich Unterschiede in der Zusammensetzung



von Futtermitteln auf den Matrixeffekt auswirken können, wurden Extrakte verschiedener Alleinfuttermittel mittels PCI untersucht. Die Matrixeffektprofile von CBX in Schweinefutter, Ferkel-Aufzuchtfutter, Hühnerfutter und Milchleistungsfutter sind in Abbildung 30 gegenübergestellt.



**Abbildung 30:** Matrixeffektprofile von CBX in Extrakten verschiedener Futtermittel (ASE mit ACN + 2 % Ameisensäure)

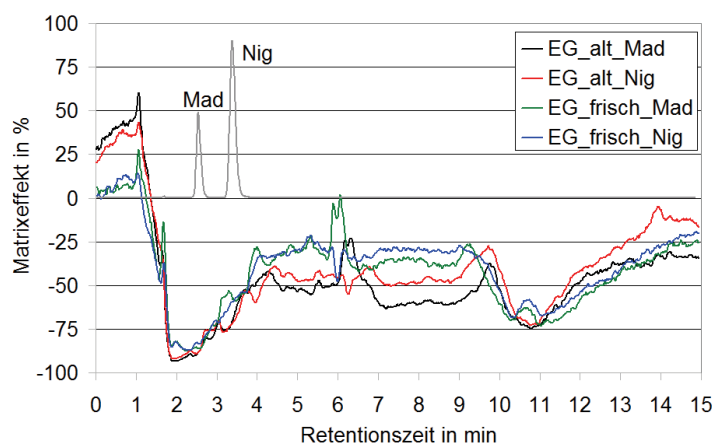
Der Verlauf der Matrixeffektprofile der verschiedenen Futtermittel war sehr ähnlich. Zur Retentionszeit der Analyten lagen zwischen den Futtermitteln maximal 25 % Unterschied im Matrixeffekt vor. Für die quantitative Bestimmung von CBX und OQX bedeutet dies, dass die Korrektur von Matrixeffekten einer Futtermittelart aufgrund des ähnlichen Matrixeinflusses auch durch die Kalibrierung mittels eines anderen Futtermittels ausreichend sein könnte. Im Rahmen der Methodvalidierung kann dies als Robustheitsparameter überprüft werden.

Insgesamt war in dem Milchleistungsfuttermittel die stärkste Signalsuppression zu beobachten. Im Retentionsbereich von 9 bis 12 Minuten zeigt das Matrixeffektprofil des Milchleistungsfutters jeweils eine stärkere Ausprägung der Signaleinbrüche auf als die anderen Futtermittel. Die für die Signalsuppression verantwortlichen Substanzen scheinen hier in höherer Konzentration vorzuliegen. Dabei könnte es sich um Protein- oder Fettkomponenten handeln, da Milchleistungsfuttermittel im Vergleich zu Mastfutter einen höheren Protein- und Fettgehalt aufweisen.

### Alter des Probenmaterials

Auch das Alter der Probe kann einen Einfluss auf den Matrixeffekt haben. Dies wurde durch den Vergleich einer frischen Eigelbprobe mit einer drei Monate im Kühlschrank gelagerten Probe überprüft. Die drei Monate alte Probe wies eine etwas dunklere Farbe auf. Dies könnte auf den Verlust von Wasser während der Lagerung hinweisen, der zur Anreicherung der gelben Farbstoffe des Dotters geführt hat. Möglicherweise haben auch chemische Reaktionen während des Alterungsprozesses zur Veränderung der Farbe

geführt. Es war deshalb zu prüfen, ob eventuelle Reaktionsprodukte zur Veränderung des Matrixeffektes geführt haben. Beide Extrakte wurden mit Hybrid SPE gereinigt. Der Unterschied im Einfluss auf das Messsignal ist relativ gering aber erkennbar, wie in Abbildung 31 zu sehen ist.



**Abbildung 31:** Matrixeffektprofile von Maduramicin und Nigericin im Extrakt von frischem und 3 Monate altem Eigelb (Extraktion mit Acetonitril mit 2 % Ameisensäure und Hybrid SPE)

Die Ausprägung des Matrixeffektes ist bei der alten Eigelbprobe stärker, z. T. bis zu 25 %. Durch Zersetzungsprozesse im Eigelb könnten vermehrt Substanzen gebildet werden, die zur Veränderung der Ionisationsausbeute bei der Electrospray Ionisation führen. Für die Quantifizierung einer Substanz in Eigelb sollte deshalb das Blindwertigelb für die Matrixkalibrierung unter gleichen Bedingungen gelagert werden wie die Probe.

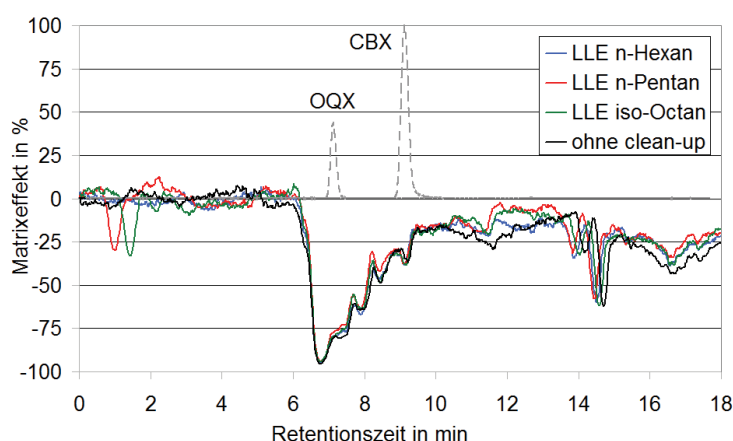
#### 4.1.4 Einfluss der Probenaufreinigung

Zur Reduktion von Matrixeffekten kann eine Probe entweder verdünnt oder aufgereinigt werden. Letztere Möglichkeit wird hauptsächlich dann angewendet, wenn die Analytkonzentration so gering ist, dass eine Verdünnung zu Konzentrationsbereichen unterhalb der Empfindlichkeit des Messgerätes führen würde. Ziel des Clean-up ist auch die Reduktion der Belastung des HPLC-Systems und des Massenspektrometers mit Probenmaterial. Besonders matrixbehaftete Proben können zur Verunreinigung des Injektionssystems führen, welche die Präzision des Injektionsvolumens und daraus resultierend des Messsignals beeinträchtigen können. Außerdem können Matrixrückstände auf der Trennsäule akkumulieren und die chromatographische Trennung der Analyten verschlechtern. Verunreinigungen durch Probenbestandteile können in der Ionisationsquelle die Stabilität des Electrosprays beeinflussen und durch Ablagerungen auf dem Quadrupol-System des Tandem-Massenspektrometers die Signalempfindlichkeit verringern.

Zur Reinigung der Probenextrakte wurden die Entfettung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) und verschiedene Festphasen getestet und der jeweilige Einfluss auf den Matrixeffekt untersucht.

### Flüssig-Flüssig-Extraktion von Futtermittelextrakten (Entfettung)

Der Extrakt (ASE mit Acetonitril mit 2 % Ameisensäure) eines Alleinfuttermittels für Schweine wurde mit verschiedenen unpolaren Lösungsmitteln (n-Hexan, n-Pentan und iso-Octan) entfettet. In Abbildung 32 sind die Matrixeffektprofile (am Beispiel von CBX) der entfetteten Extrakte im Vergleich zum unbehandelten Extrakt dargestellt.



**Abbildung 32:** Matrixeffektprofile von CBX in Futtermittelextrakten nach Entfettung durch LLE mit verschiedenen unpolaren Lösungsmitteln (ACN + 2 % Ameisensäure)

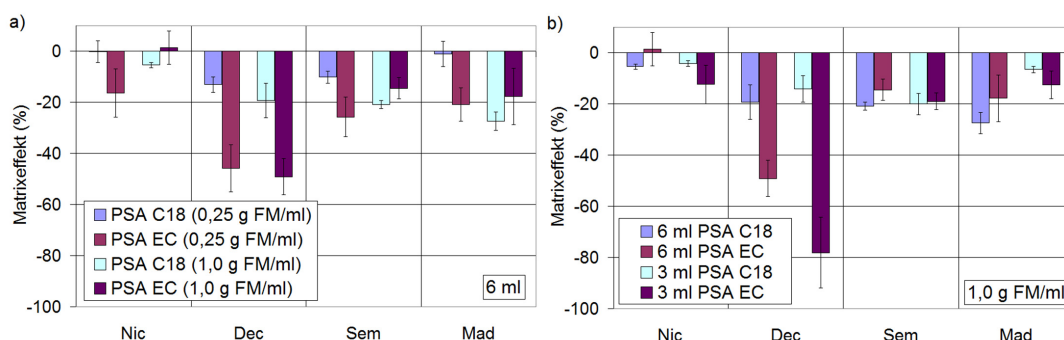
Die Profile verlaufen nahezu identisch und zeigen keine Reduktion des Matrixeffektes durch den Entfettungsschritt. Die für die Matrixeffekte verantwortlichen Probenbestandteile lassen sich mit den verwendeten Lösungsmitteln nicht entfernen.

Die Profile verlaufen nahezu identisch und zeigen keine Reduktion des Matrixeffektes durch den Entfettungsschritt. Die für die Matrixeffekte verantwortlichen Probenbestandteile lassen sich mit den verwendeten Lösungsmitteln nicht entfernen.

### Dispersive Festphasenextraktion zur Reinigung von Futtermittelextrakten

Zwei dSPE-Varianten mit C18-Material und Aktivkohle wurden zur Aufreinigung von Extrakten verglichen. Die ermittelten Matrixeffekte nach Aufreinigung verschiedener Extraktvolumina und verschiedener Matrixkonzentrationen in der Messlösung sind exemplarisch für Nicarbazin, Decoquinat, Semduramicin und Maduramicin in Abbildung 33 dargestellt. Die Matrixstärke von 0,25 g Futtermittel pro ml (Abbildung 33a) entspricht der aus den Extraktionsversuchen in Kapitel 4.1.1.

Die beiden dispersiven Festphasen hatten vergleichbare Reinigungseffekte für Nicarbazin, Semduramicin und Maduramicin. Matrixeffekte konnten gegenüber den ungereinigten Extrakten (Vgl. Abbildung 17 a) um 10 % bis 40 % reduziert werden, wobei das C18-Material effektiver war. Für Decoquinat wurde der Matrixeffekt mit C18-Material leicht reduziert, durch das PSA Envi Carb Material dagegen verstärkt. Daraus folgt, dass es sich bei den störenden Matrixbestandteilen um unpolare Substanzen handeln



**Abbildung 33:** Matrixeffekte auf Nicarbazin, Decoquinat, Semduramicin und Maduramicin in Futtermittlextrakt nach Reinigung mittels dSPE PSA C18 und dSPE PSA Envi Carb (EC) - Vergleich von a) verschiedenen Matrixstärken im Endextrakt (1,0 g FM/ml, 0,25 g FM/ml) bei 6 ml Extrakt, sowie von b) 3 ml und 6 ml Extrakt bei 1 g FM/ml Matrixstärke. Fehlerbalken zeigen Standardabweichung (n=2)

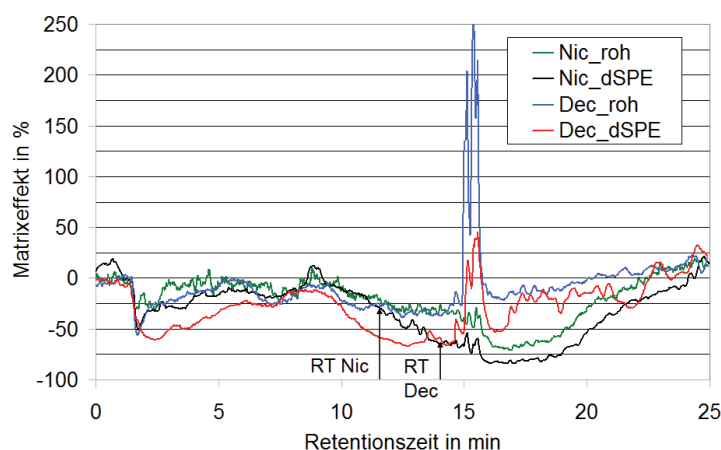
muss, da ihre Konzentration im Extrakt und damit ihr Einfluss auf das Analytsignal offensichtlich durch Adsorption an C18-Material reduziert wurde. Eine Hypothese für den verstärkten Matrixeffekt bei Verwendung der Aktivkohlekartuschen ist die Adsorption von Decoquinat an Aktivkohlepartikel, die nach Zentrifugation des gereinigten Extraktes in der Lösung zurückbleiben. Die Ursache wäre daher also keine Ionensuppression, sondern ein Verlust während der Aufreinigung. Die Wiederfindungsraten mit dem C18-Material waren mit 60 % bis 90 % akzeptabel. Mit dem Aktivkohlematerial wurden nur 20 % - 77 % der Ionophore, von den chemischen Kokzidiostatika sogar nur 4 % bis 15 % wiedergefunden. Diese hohen Verluste können auf die starken Wechselwirkungen der planaren *p*-Elektronen der aromatischen Systeme der chemischen Kokzidiostatika mit den *n*-Elektronen der Aktivkohle zurückgeführt werden [151]. Im Fall von Lasalocid ist die geringe Wiederfindung von 20 % durch die Phenylengruppe des Moleküls zu erklären.

Die Erhöhung der Matrixkonzentration (1 mg FM/ml) durch Einengung des gereinigten Extraktes führte bei dem Großteil der Analyten zur Verstärkung des Matrixeffektes. Da dieser Effekt sehr unterschiedlich ausfiel, ist eine durch das Einengen angestrebte Verbesserung der Nachweisgrenze der Multimethode nicht realisierbar. Die Verwendung verschiedener Extraktvolumina sollte zeigen, ob die Reinigungskapazität des dSPE-Röhrchens bei der verwendeten Matrixkonzentration ausreichend ist. Die Reinigung von 3 ml Extrakt identischer Matrixstärke (1 g FM/ml) führte nur in wenigen Fällen zur Reduktion des Matrixeffektes gegenüber der Verwendung von 6 ml Extrakt, wie Abbildung 33 b) zeigt. Meist blieb der Matrixeffekt gleich oder wurde sogar verstärkt, wie bei Decoquinat. Dies bestätigt die Hypothese zum Verlust von Decoquinat durch Adsorption an Aktivkohlepartikel. Bei geringerem Extraktvolumen ist die Konzentration dieser Teilchen im Extrakt höher, sodass mehr Decoquinat-Moleküle adsorbiert und für die Messung verloren gehen können. Eine weitere Erklärung könnten durch das Cleanup-Material zusätzlich eingebrachte Störsubstanzen sein. Lösen sich diese Substanzen im Extrakt, so ist deren Konzentration bei geringerem Extraktvolumen entsprechend

höher. Dies wäre denkbar, wenn die Sättigungskonzentration der im Extrakt gelösten Substanzen noch nicht erreicht wurde. Daraus möglicherweise resultierende exogene Matrixeffekte werden in Kapitel 4.2 genauer untersucht und diskutiert.

Die Schwankungen der Matrixeffekte zwischen zwei Messungen betragen bis zu  $\pm 15\%$ , z. B. für Decoquinat (siehe Fehlerbalken in Abbildung 33) dargestellt. Eine mögliche Ursache sind abrupte Änderungen des Matrixeffektes im Retentionsbereich des Analyten. Die Betrachtung der Matrixeffektprofile im Folgenden kann darüber Aufschluss geben. Solche Schwankungen können die Präzision einer Analysenmethode beeinträchtigen. Neben mangelnder Empfindlichkeit stellt dies eine typische Folge von Matrixeffekten dar [131].

Mittels PCI wurden Matrixeffektprofile für die Rohextrakte des Alleinfuttermittels nach der Aufreinigung von 6 ml Extrakt mit PSA C18 dSPE erstellt (siehe Abbildung 34). Die Matrixeffekte zur Retentionszeit der Analyten sind mit dem jeweils dritten (hellblauen) Balken in Abbildung 33 a) zu vergleichen.

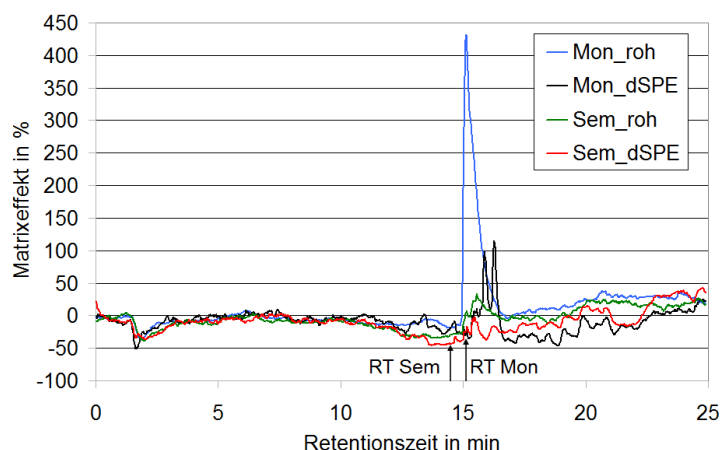


**Abbildung 34:** Matrixeffektprofile von Nicarbazin und Decoquinat in Futtermittlextrakt ohne Aufreinigung (roh) und nach dispersiver SPE (PSA C18)

Die Retentionszeit der Analyten ist jeweils mit einem Pfeil im Profil markiert. Zur Veranschaulichung des Reinigungseffektes wurden in der Messreihe auch Profile des Rohextraktes aufgezeichnet und abgebildet. Der mit der PCI ermittelte Matrixeffekt zur Retentionszeit der chemischen Kokzidiostatika Nicarbazin und Decoquinat ist deutlich höher als der nach post extraction addition bestimmte. Mit beiden Untersuchungsmethoden wurde Signalsuppression nachgewiesen.

Gleiches gilt auch für die ionophoren Kokzidiostatika in Abbildung 35. Die Matrixeffektprofile von Semduramicin und Maduramicin verliefen fast identisch, deshalb wurde das Matrixeffektprofil von Monensin in Abbildung 35 dargestellt. Wie schon in 4.1.1 beschrieben, wird das Signal von Monensin in der Matrix Futtermittel extrem verstärkt, (hier  $> 200\%$ ). Der Vergleich der Matrixeffektprofile der gereinigten und der Rohextrakte zeigt einen deutlichen Reinigungseffekt der dispersiven Festphasenextraktion. Besonders das Monensin-Signal erfährt eine drastische Verbesserung durch das Clean-up. Die

Signalverstärkung zwischen 10 und 15 Minuten wurde vollständig eliminiert, jedoch liegt im gereinigten Extrakt eine zusätzliche peakartige Signalverstärkung vor. Dabei könnte es sich um einen exogenen Matrixeffekt handeln. Zur Retentionszeit von Semduramicin hat die Aufreinigung kaum Einfluss auf das Signal.



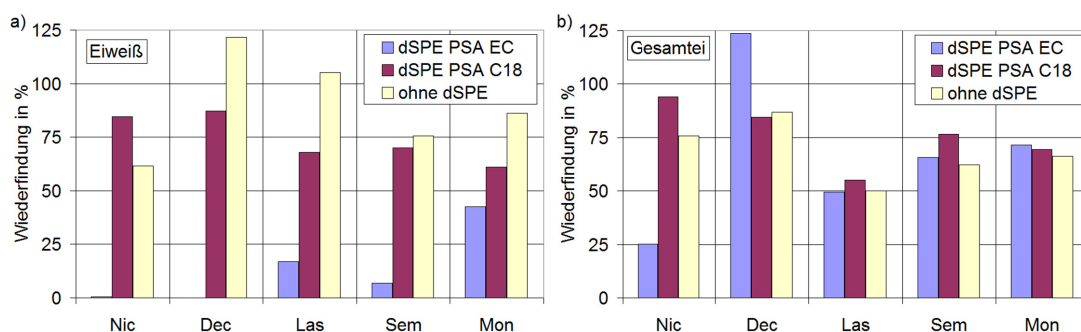
**Abbildung 35:** Matrixeffektprofile von Monensin und Semduramicin in Futtermittelextrakt ohne Aufreinigung (roh) und nach dispersiver SPE PSA C18 (dSPE)

### Dispersive Festphasenextraktion zur Reinigung von Ei-Extrakten

Eiweiß- und Gesamtei-Extrakte wurden ebenfalls mittels dSPE gereinigt. Auch hier wurden die beiden Varianten mit C18-Material und Aktivkohle getestet.

#### Pre- und post extraction addition

Abbildung 36a) zeigt, dass trotz der Verluste mit der C18-dSPE in der Matrix Eiweiß zufriedenstellende Wiederfindungsraten für alle Analyten erzielt wurden.

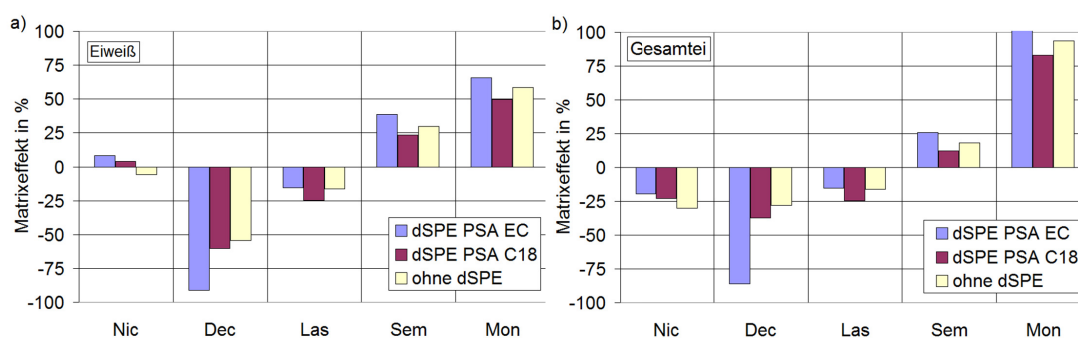


**Abbildung 36:** Wiederfindung von Kokzidiostatika in Eiweiß- (a) und Gesamteiextrakt (b) nach dSPE PSA ENVI Carb (EC) und dSPE PSA C18 und ohne dSPE

Dagegen wurde mit der Aktivkohle-dSPE unter 10 % bis maximal 50 % wiedergefunden.

Der vollständige Verlust von Nicarbazin und Decoquinat in Eiweiß auf der Aktivkohle-Festphase ist vermutlich die Folge der bereits beschriebenen Wechselwirkung der *n*-Elektronen-Systeme. [151] Im Vergleich dazu sind die Wiederfindungsraten nach ENVI Carb dSPE in der Matrix Gesamtei deutlich höher (Abbildung 36 b). Aufgrund der geringeren Matrixbelastung im Eiweißextrakt verschiebt sich das Verhältnis von Analytmolekülen und Matrixbestandteilen zugunsten der Analyten.

Die Adsorption der Analytmoleküle mit aromatischer Struktur an die Festphase wird dadurch begünstigt und führt zu größeren Verlusten an Analyt als bei einer komplexeren Matrix wie Gesamtei. Bei letzterer ist der Anteil der Störkomponenten deutlich höher, die Adsorption von Analytmolekülen an der Festphase ist deshalb unwahrscheinlicher. Für die Mehrzahl der Analyten ergeben sich mit der ENVI Carb-dSPE jeweils ähnliche Wiederfindungsraten wie mit der C18-dSPE und ohne dSPE. Abbildung 37 zeigt die Matrixeffekte ausgewählter Analyten in Eiweiß und Gesamtei, mit und ohne dSPE. Die Matrixeffekte unterscheiden sich deutlich in Abhängigkeit von Analyt und Ionisationsmodus. Während bei den negativ ionisierten Substanzen, Ethopabat und Nicarbazin, kaum Effekte auftreten, unterliegen die positiv ionisierten Kokzidiostatika z. T. starker Signalsuppression und auch -verstärkung.



**Abbildung 37:** Matrixeffekte auf Kokzidiostatika in Eiweiß- (a) und Gesamteiextrakt (b) nach dSPE PSA ENVI Carb (EC) und dSPE PSA C18 und ohne dSPE

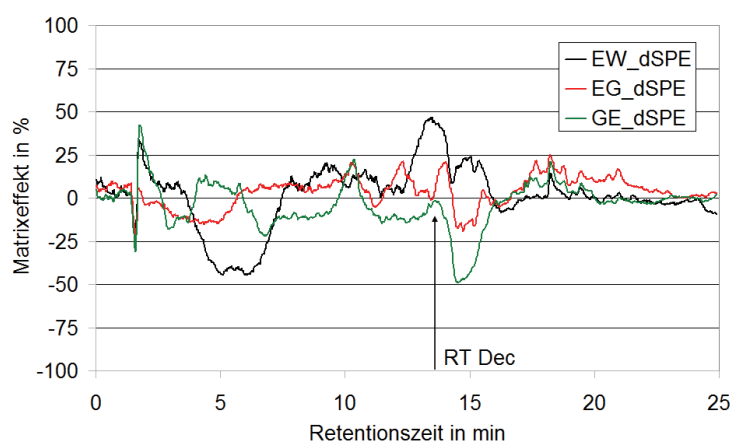
Die Ionophore Lasalocid und Semduramicin unterliegen trotz gleicher Retentionszeit gegensätzlichen Matrixeffekten. Bei keiner der Substanzen ist durch die dispersive SPE eine deutliche Minderung der Matrixeffekte erkennbar. Das Messsignal von Decoquinat wird scheinbar bei der Verwendung der Aktivkohle enthaltenden dispersiven Festphase stärker unterdrückt. Dies könnte, wie für die Aufreinigung von Futtermittelextrakten bereits diskutiert, auf einen Analytverlust durch Adsorption an das Aktivkohlematerial verursacht werden. Da die Analyten bei der post extraction addition zur Ermittlung des Matrixeffektes keinen direkten Kontakt zum Festphasenmaterial haben, könnten kleinste Partikel des Aktivkohlematerials im Zentrifugat des gereinigten Extraktes verantwortlich sein. Die durch Eiweiß und durch Gesamtei verursachten Matrixeffekte sind nahezu identisch. Im Gegensatz zum Futtermittel liegt für die Signale der Ionophore, bis auf Lasalocid, in den Eimatrices eine Signalverstärkung vor. Unter der Annahme, dass hauptsächlich Substanzen der Protein- und Lipidfraktion für Matrixeffekte verursachen,



müssten im Fall von Eiweiß und Gesamtei eher Proteinbestandteile für die Signalverstärkung verantwortlich gemacht werden, da das Eiklar nahezu fettfrei ist.

### Postcolumn infusion

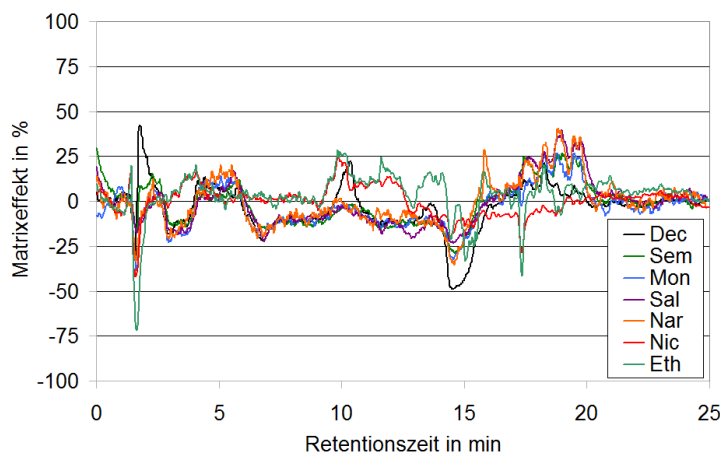
Das Matrixeffektprofil von Decoquinat in Eiweiß (Abbildung 38) zeigt nach der Reinigung mit dSPE stärkere Störungen als ohne Clean-up (vgl. Abbildung 28). Dagegen führte die dSPE des Eigelbextrakts zu einer deutlichen Reduktion der Matrixeffekte. Der mit PSA C18 gereinigte Gesamtei-Extrakt unterschied sich in seinem Matrixeffektprofil kaum von dem des unbehandelten Extraktes (siehe Abbildung 26). Die Matrixeffekte in den Hauptbereichen der Signalsuppression und -verstärkung wurden durch das Clean-up leicht reduziert.



**Abbildung 38:** Matrixeffektprofile von Decoquinat in Eiweiß- (EW), Eigelb- (EG) und Gesamtei-Extrakt (GE) nach dispersiver SPE (PSA C18)

Die Übersicht der Matrixeffektprofile in Abbildung 39 zeigt, dass die Reinigung des Gesamteixtraktes mittels dispersiver SPE für die Mehrzahl der Analyten zu einer Reduktion des Matrixeffektes im Vergleich zum unbehandelten Extrakt (Abbildung 26) führt. Der Bereich der Signalverstärkung ab 15 Minuten Retentionszeit ist nach der Aufreinigung mit dSPE weniger ausgeprägt.

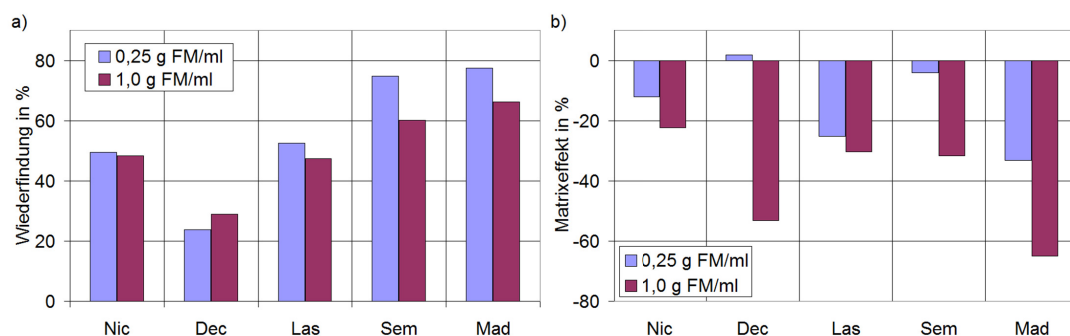




**Abbildung 39:** Matrixeffektprofile ausgewählter Kokzidiostatika in Gesamteiextrakt nach dispersiver SPE (PSA C18)

#### Strata X polymer reversed phase SPE zur Reinigung von Futtermitelextrakten

Zur Aufreinigung von Futtermitelextrakten mit Strata X SPE-Kartuschen wurden zwei Matrixkonzentrationen (0,25 g und 1,0 g Futtermittel pro ml Extraktionslösung) getestet. Abbildung 40 a) zeigt die ermittelten Wiederfindungsraten ausgewählter Analyten, geordnet nach der Retentionszeit. Zwischen den Wiederfindungsraten bei verschiedenen Matrixkonzentrationen ist kein eindeutiger Unterschied erkennbar, tendenziell ist die Wiederfindung bei der hohen Matrixkonzentration etwas niedriger.



**Abbildung 40:** Wiederfindungsraten (a) und Matrixeffekte (b) ausgewählter Kokzidiostatika im Extrakt dotierten Futtermittels nach Strata X Polymer SPE (bei Matrixstärken von 0,25 g und 1,0 g Futtermittel pro ml Extrakt)

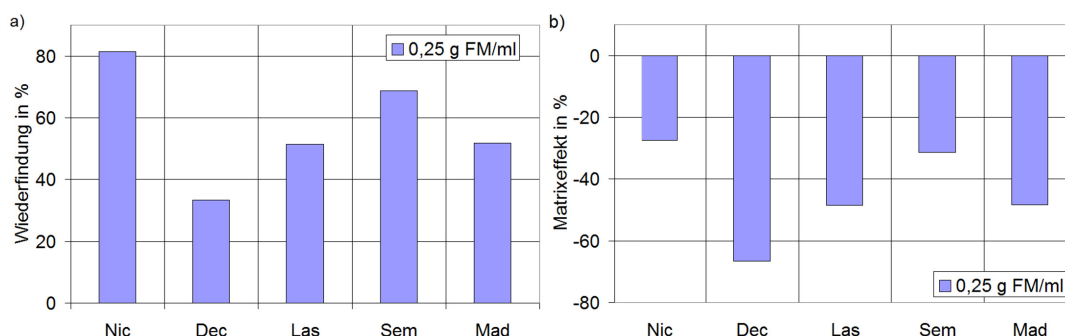
Die Kapazität der Festphase wurde offensichtlich nicht überschritten. Während die Wiederfindungsraten der chemischen Kokzidiostatika mit zunehmender Retentionszeit sinken, steigen die der Ionophore in der Elutionsreihenfolge. Gegenüber dem unbehandelten Acetonitril-Extrakt (Vgl. Abbildung 17 a) war für die Mehrzahl der Analyten eine Reduktion des Matrixeffektes zu beobachten (siehe Abbildung 40b). Der Effekt auf die

unpolarsten Substanzen Narasin und Maduramicin blieb etwa gleich. Außerdem ist erwartungsgemäß ein stärkerer Matrixeffekt bei der höheren Matrixkonzentration zu verzeichnen. Die Verstärkung des Matrixeffektes bei vierfacher Matrixstärke ist sehr unterschiedlich ausgeprägt.

Wie bei der dispersiven SPE lag auch nach der Polymer RP SPE (Strata X) hauptsächlich Signalunterdrückung vor. Am stärksten war Narasin mit – 75 % Matrixeffekt betroffen. Dagegen wurden die Signale von Ethopabat und Nicarbazin bei der höheren Matrixkonzentration um maximal 24 % unterdrückt. Nach der Aufreinigung mit Strata X waren tendenziell ähnliche Matrixeffekte zu verzeichnen, wie nach Aufreinigung mit PSA C18 dispersiver SPE. Die Ergebnisse der PCI werden im folgenden Abschnitt im Vergleich zur Oasis HLB SPE dargestellt und diskutiert.

### Oasis HLB SPE zur Reinigung von Futtermittlextrakten

Die Oasis HLB Kartusche wurde für die Kokzidiostatika-Multimethode mit pre- und post extraction addition bei einer Matrixstärke von 0,25 g Futtermittel pro Milliliter Extrakt getestet. Die Ergebnisse ausgewählter Analyten sind in Abbildung 41 aufgetragen. Die Wiederfindungsraten lagen zwischen 30 % und 80 % und waren damit bis auf Nicarbazin etwas niedriger als mit der Strata X SPE.



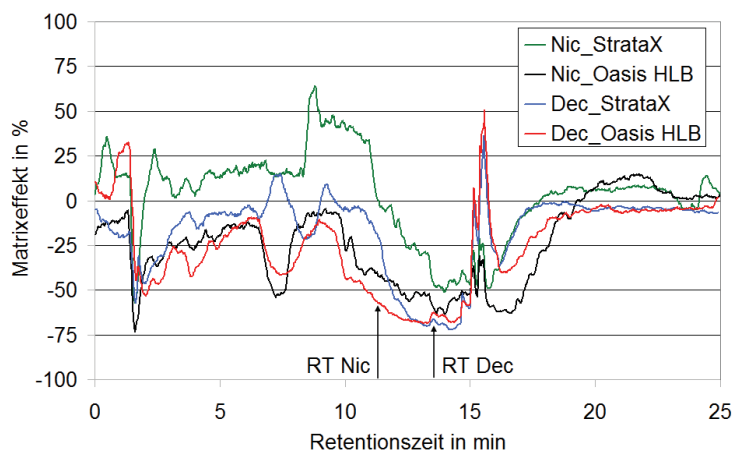
**Abbildung 41:** Wiederfindungsraten (a) und Matrixeffekte (b) ausgewählter Kokzidiostatika im Extrakt dotierten Futtermittels nach Oasis HLB SPE (Matrixstärke 0,25 g FM/ml)

Der Matrixeffekt des Futtermittels wurde durch die Oasis HLB SPE teilweise reduziert, für einige Analyten aber verstärkt. Zur Aufreinigung war diese Kartusche im Vergleich zur Strata X SPE weniger gut geeignet. Die mit den SPE-Varianten gereinigten Extrakte wurden auch mittels PCI untersucht.

### Postcolumn infusion

In Abbildung 42 sind die Matrixeffektprofile von Nicarbazin und Decoquinat in den mit SPE gereinigten Futtermittlextrakten gegenübergestellt. Die Matrixeffektprofile der beiden untersuchten Festphasen, Strata X und Oasis HLB verlaufen ähnlich. Mit der Oasis HLB SPE ist die Signalsuppression insgesamt etwas stärker ausgeprägt als mit der Strata X SPE, was die Ergebnisse der post extraction addition bestätigt. Der Bereich

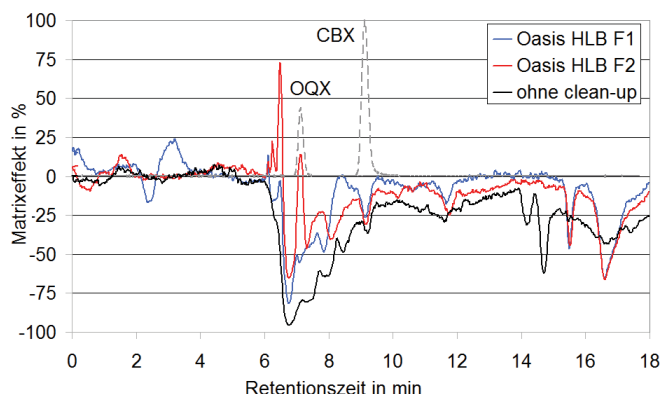
der Verstärkung des Decoquinat-Signals ab 15 min ist im Vergleich zum unbehandelten Extrakt (Vgl. Abbildung 18) deutlich reduziert.



**Abbildung 42:** Matrixeffektprofile von Nicarbazin und Decoquinat in Futtermittlextrakt (0,25 g FM/ml) nach Schüttelextraktion (Acetonitril) und SPE (StrataX und Oasis HLB)

Betrachtet man den Aufreinigungseffekt der SPE anhand des Matrixeffektes im Profil zur Retentionszeit der Analyten, so stimmen die Ergebnisse der post extraction addition und der PCI nicht überein. Im Vergleich zum Futtermittlextrakt ohne Aufreinigung (Matrixeffektprofile siehe Abbildung 34) liegt nach der Festphasenextraktion für Nicarbazin ein um 25 % (Oasis HLB) bzw. 70 % (Strata X) reduzierter Matrixeffekt im relevanten Retentionsbereich vor. Der Matrixeffekt auf Decoquinat bleibt etwa gleich. Zur Bestimmung von CBX und OQX in Futtermitteln wurde ebenfalls die Oasis HLB-Kartusche zur Aufreinigung getestet. CBX und OQX wurden getrennt voneinander mit verschiedenen Anteilen Methanol (F1: 20 % MeOH; F2: 50 % MeOH) von der Kartusche eluiert. Die post extraction addition zeigte lediglich eine leichte Verringerung der Signalsuppression für CBX.

Beide Elutionsfraktionen wurden mittels PCI untersucht und die Matrixeffektprofile von CBX dem Profil ohne Aufreinigung gegenübergestellt (Abbildung 43). Eine Reduktion der Signalsuppression ist nur zur Retentionszeit von OQX zu erkennen. Auffällig ist der Verlauf des Matrixeffektprofils der zweiten SPE-Elutionsfraktion mit mehreren Wechseln zwischen Signalverstärkung und –unterdrückung. Die peakartige Signalverstärkung zwischen 6 und 7 min könnte durch den Eintrag von Substanzen aus der Probenaufarbeitung, offensichtlich durch die SPE-Kartusche, verursacht worden sein.

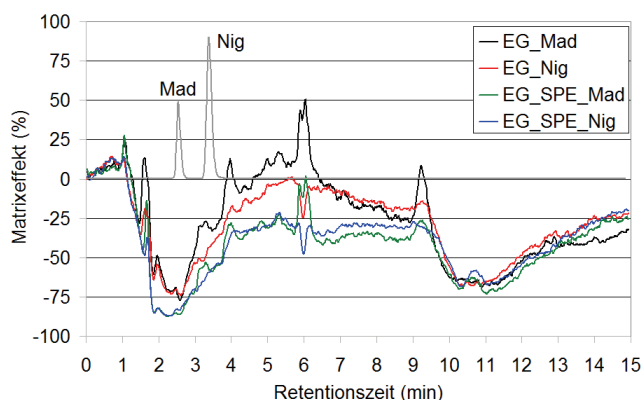


**Abbildung 43:** Matrixeffektprofile von CBX in Futtermittlextrakt (0,3 g Futtermittel/ml Extrakt) nach ASE (ACN + 2 % Ameisensäure) und Oasis HLB SPE (Elutionsfraktionen F1, F2)

Ob es sich um eine zufällige Verunreinigung handelte, müsste durch Untersuchung weiterer Chargen der SPE-Kartusche überprüft werden. Trotz reduzierter Matrixeffekte ist die SPE-Aufreinigung für die Bestimmung von CBX und OQX nicht effizient, da die Wiederfindungsraten durch den Aufreinigungsschritt um bis zu 15 % sanken. Die stark schwankenden Matrixeffekte im gereinigten Extrakt bergen zudem Potential zur Verschlechterung der Messpräzision.

#### Hybrid SPE zur Reinigung von Eigelbextrakten (Maduramicin-Einzelmethode)

Die bei Anwendung der Maduramicin-Einzelmethode auftretenden Matrixeffekte wurden ebenfalls untersucht. Die Matrixeffektprofile von Maduramicin und Nigericin in Eigelb-Extrakt mit und ohne Reinigung mit HybridSPE sind in Abbildung 44 dargestellt.



**Abbildung 44:** Matrixeffektprofile von Maduramicin und Nigericin in unbehandeltem Eigelbextrakt und nach Hybrid SPE

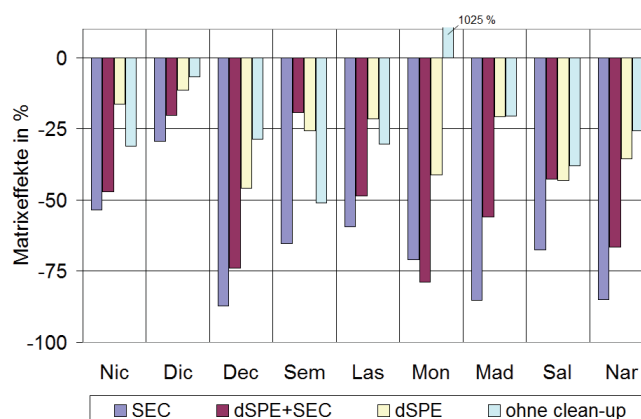
Der Verlauf der Profile ist ähnlich, im Retentionsbereich um 6 Minuten ist der Matrixef-

fekt auf Maduramicin und Nigericin jedoch gegensätzlich. Das Signal von Maduramicin wird verstärkt, während das Nigericin-Signal unterdrückt wird. Dieser Effekt tritt sowohl bei dem über HybridSPE gereinigten als auch dem nicht gereinigten Eigelb-Extrakt auf. Die Signalunterdrückung im Retentionsbereich von 2 bis 4 Minuten ist bei dem gereinigten Probenextrakt etwas stärker ausgeprägt. Allerdings ist der Verlauf des Matrixeffektes gleichmäßiger und das Profil enthält geringere Schwankungen.

Dies kann sich vorteilhaft auf die Reproduzierbarkeit der Analysenergebnisse auswirken, da der Matrixeffekt im Fall von chromatographischen Schwankungen, z.B. durch Veränderungen der stationären Phase, konstant bleibt. Zu diesem Effekt trägt zusätzlich bei, dass die Profile von Maduramicin und Nigericin nach Hybrid SPE bis nahezu deckungsgleich sind. Ohne Aufreinigung des Extraktes führen schon kleine Retentionszeitschwankungen zu einem veränderten Matrixeffekt. Neben der Minimierung des Einflusses der Matrix auf das Analysenergebnis diene die Reinigung der Extrakte auch zur Schonung der HPLC-Säule und des Massenspektrometers, da im Rahmen der Carry-over-Studie eine Vielzahl an Eiprobe untersucht werden sollten.

### Fraktionierung mittels Größenausschluss

Zur Reinigung der Futtermittlextrakte sollte neben der Umkehrphasenchromatographie als weiteres Trennprinzip die Größenausschlusschromatographie getestet werden. Durch Fraktionierung über HPLC mit einer Trennsäule mit 300 Å Ausschlussvolumen sollten Störkomponenten über diesem Molekülvolumen von den Analyten getrennt werden. Die Fraktionierung wurde mit unbehandeltem und mit dSPE-gereinigtem Acetonitril-Extrakt durchgeführt. Dabei wurden die Analyten in zwei Fraktionen von der Größenausschlusssäule eluiert, um einen möglichst großen Anteil der Matrixkomponenten abzutrennen. In Fraktion 1 wurde nur Ethobapat eluiert, in Fraktion 2 alle übrigen Kokzidiostatika. Abbildung 45 zeigt die Matrixeffekte für die Messung der Fraktion 2 im Vergleich zum unbehandelten Extrakt und dem dSPE-gereinigten Extrakt.



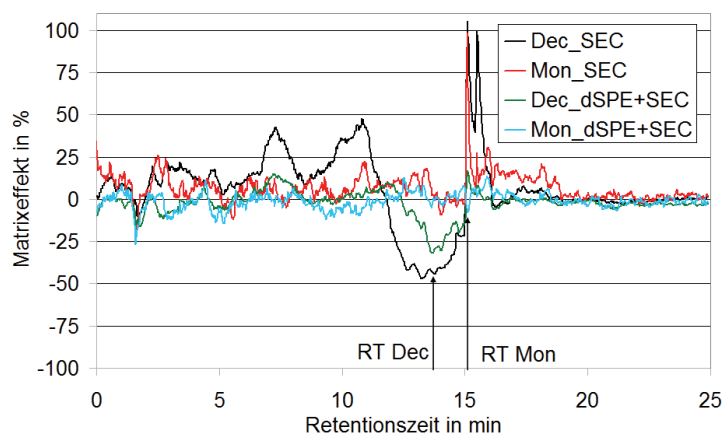
**Abbildung 45:** Matrixeffekt einer Futtermittelprobe auf ausgewählte Kokzidiostatika nach Fraktionierung mittels Größenausschluss (Fraktion 2)

In den fraktionierten Extrakten wurde ausschließlich Signalsuppression (bis zu 88 %) beobachtet. Bei Vorbehandlung mit dispersiver SPE war der Matrixeffekt gegenüber dem ausschließlich fraktionierten Extrakt bis zu 45 % reduziert. Im Vergleich dazu war der Matrixeffekt im Rohextrakt bzw. dem dSPE-gereinigten Extrakt deutlich niedriger. Die für Monensin im unbehandelten Futtermittelextrakt beobachtete Signalverstärkung trat bei keinem der gereinigten Extrakte auf.

Eine effektive Abtrennung von Störkomponenten durch die Fraktionierung nach Größenausschluss konnte mit der post extraction addition nicht nachgewiesen werden.

### Postcolumn infusion

Die mittels PCI ermittelten Matrixeffektprofile der Fraktion 2 sind für zwei ausgewählte Analyten in Abbildung 46 dargestellt. Die mit der post extraction addition gemessenen Effekte konnten mit dieser Methode nicht bestätigt werden. Zur Retentionszeit von Decoquinat wurde eine Signalsuppression um 40 % bzw. 28 % bei vorhergehender dSPE gemessen und ist damit deutlich geringer als mit der post extraction addition. Das Monensin-Signal wird zur entsprechenden Retentionszeit um etwa 100 % verstärkt, mit zusätzlicher dSPE wurden 0 % Matrixeffekt ermittelt.



**Abbildung 46:** Matrixeffektprofile von Decoquinat und Monensin in Futtermittelextrakt nach Fraktionierung mittels Größenausschluss (mit und ohne vorherige disperse SPE)

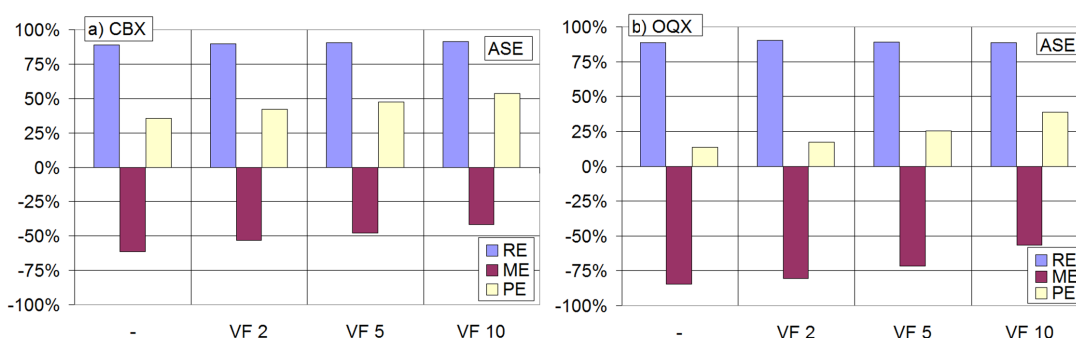
Im Vergleich zu Abbildung 34 und Abbildung 35 in Kapitel 4.1.4 ist eine deutliche Reduktion des Matrixeinflusses durch die Fraktionierung durch Größenausschluss zu beobachten. Die für Monensin und Decoquinat im unbehandelten Futtermittelextrakt beobachtete Signalverstärkung ab ca. 15 min Retentionszeit liegt nach Fraktionierung nicht mehr vor. In Kombination mit der Vorreinigung durch die PSA C18 dSPE wurde der Matrixeffekt auf alle Signale reduziert. Das entsprechende Matrixeffektprofil von Monensin weist nur noch vernachlässigbare Signalsuppression und -verstärkung auf. Die Ergebnisse von PCI und post extraction addition sind wie auch in vorhergehenden Abschnitten gegensätzlich. Beide Techniken sind Modelle zur Betrachtung von Matrixef-

fechten, deren Grenzen hierdurch aufgezeigt werden. Eine Korrektur von Matrixeffekten oder konkrete Aussagen zum Einfluss der Matrix auf das Analysenergebnis sind anhand dieser Techniken nicht möglich. Der Matrixeinfluss muss im Rahmen der Validierung einer Analysenmethode anhand von Präzisionsparametern evaluiert werden.

#### 4.1.5 Matrixstärke – Aufkonzentrieren und Verdünnen

Die Matrixstärke, also der Anteil an Probenmaterial im Extrakt, ist entscheidend für den Matrixeffekt. Ein Ziel der Methodenentwicklung ist deshalb die minimal notwendige Matrixstärke zu ermitteln, um eine für die quantitative Bestimmung ausreichende Menge des Analyten extrahieren zu können. Bei Analysenmethoden mit sehr niedrigen Zielkonzentrationen ( $< 1 \mu\text{g/kg}$ ) kann es erforderlich sein, die Analytkonzentration im Extrakt durch Einengen zu erhöhen. Die damit verbundene Erhöhung der Matrixstärke führt meist zur Verstärkung des Matrixeffektes, wie in Kapitel 4.1.4 am Beispiel dSPE-gereinigter Futtermittlextrakte gezeigt wurde.

Eine gängige Methode zur Reduktion von Matrixeffekten ohne Aufreinigung ist das Verdünnen von Probenextrakten („dilute and shoot“). Die Verdünnung des Extraktes geht zwar mit der Reduktion der Analytkonzentration einher, jedoch nimmt das Analytsignal durch die geringere Matrixstärke nicht proportional ab. Dieser Ansatz bietet sich für die Bestimmung von CBX und OQX in Futtermittel in dem verhältnismäßig hohen Konzentrationsbereich des MRPL (CBX:  $4 \text{ mg/kg}$ ; OQX:  $3 \text{ mg/kg}$ ) an. Die pre- und post extraction addition wurden bei einer Konzentration von  $3,3 \text{ mg/kg}$  Futtermittel entsprechend  $1 \mu\text{g/ml}$  Extrakt durchgeführt. Die Verdünnung dieser Extrakte um Faktor 2 bis 10 führte zur Reduktion des Matrixeffektes um bis zu 20 % für CBX und bis zu 30 % für OQX (Abbildung 47).

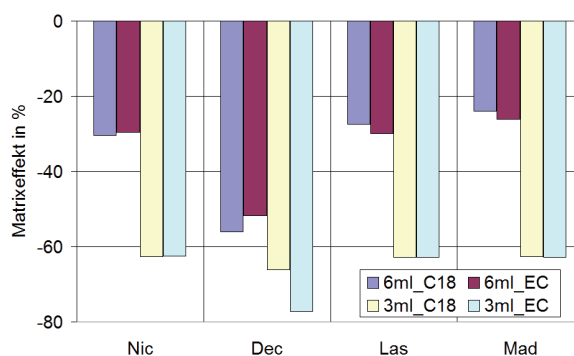


**Abbildung 47:** Wiederfindung (RE), Matrixeffekt (ME) und Prozesseffizienz (PE) von CBX (a) und OQX (b) in verdünnten Futtermittlextrakten (ASE mit ACN + 2 % Ameisensäure) mit Verdünnungsfaktoren (VF) 2, 5 und 10 und unverdünnt (-)

Bei konstanten Wiederfindungsraten wurde die Prozesseffizienz für beide Analyten um ca. 20 % verbessert.

## 4.2 Exogene Matrixeffekte

Matrixeffekte können nicht nur endogen durch Probenbestandteile, sondern können auch durch exogen, z. B. während der Aufreinigung, eingebrachte Substanzen verursacht werden [123]. Deshalb wurde zur Untersuchung des Einflusses der dSPE-Aufreinigung ein post extraction addition Experiment ohne Matrix durchgeführt. Dazu wurde die dSPE Reinigung mit 3 ml und 6 ml reinem Acetonitril durchgeführt und der durch das Clean-up-Material verursachte Matrixeffekt berechnet (siehe Abbildung 48).



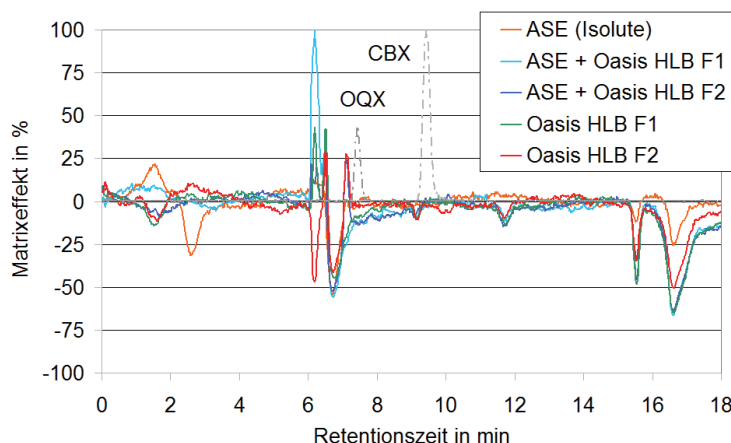
**Abbildung 48:** Exogene Matrixeffekte – Matrixeffekte auf ausgewählte Kokzidiostatika in Acetonitril nach dSPE (PSA Envi Carb - EC, PSA C18) von 3 ml und 6 ml des Lösungsmittels

Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen, dass der Einfluss exogen, in diesem Fall durch das Clean-up, eingebrachter Komponenten nicht zu vernachlässigen ist. Das Signal der Analyten wurde um 25 % bis zu 75 % unterdrückt. Der Matrixeffekt war für die beiden dSPE-Materialien jeweils gleich. Dies lässt vermuten, dass die Störkomponenten aus einem den beiden Festphasen gemeinsamen Materialien entstammen. Denkbar wären Verunreinigungen der Kunststoffoberfläche des dSPE-Röhrchens oder Rückstände von Aminierungsreagens aus der PSA-Herstellung. Da die Röhrchen aus Polypropylen bestehen, ist mit der Extraktion von Weichmachern nicht zu rechnen. Eine Konditionierung der dSPE-Röhrchen könnte zur Reduktion der Störsubstanzen führen, dies wurde hier jedoch nicht geprüft.

Der Einfluss der exogenen Störsubstanzen ist bei 3 ml behandeltem Acetonitril stärker als bei 6 ml. Dies unterstützt die Vermutung, dass Störsubstanzen von der Festphase oder auch aus dem Kunststoff-Röhrchen der dSPE gelöst werden, da bei geringerem Volumen die Konzentration der Substanzen in der Lösung, und damit der Matrixeffekt zunimmt. Der exogene Matrixeffekt durch die dispersive SPE ist bei den chemischen Kokzidiostatika etwas stärker ausgeprägt als bei den ionophoren Kokzidiostatika, wobei Decoquinat am stärksten betroffen ist. In Anwesenheit von Matrix kann der Einfluss der exogenen Störkomponenten abnehmen, da auch zwischen endogenen und exogenen Störsubstanzen eine Konkurrenz um Ladungsträger besteht. Eine Berechnung des rein endogenen Matrixeffektes nach dSPE durch Subtraktion des exogenen Matrixeffektes vom Gesamtmatrixeffekt ist nicht möglich, da bei Anwesenheit von Matrix weitere Wechselwirkungen zwischen Matrix, Analyt und Festphase zum Tragen kommen.



Die durch Reagenzien verursachten Matrixeffekte wurden auch mittels PCI untersucht. Der Extraktions- und Aufreinigungsschritt für die Probenaufarbeitung von CBX und OQX wurden dazu einzeln und kombiniert mit reinem Lösungsmittel (ohne Probenmaterial) durchgeführt.



**Abbildung 49:** Matrixeffektprofile von CBX in Reagenzien der ASE mit ACN+ 2 % Ameisensäure mit und ohne anschließende SPE (Oasis HLB)

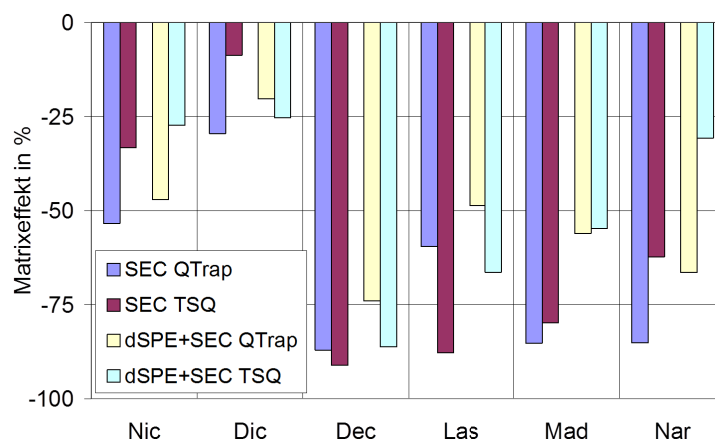
Die Matrixeffektprofile von CBX in den behandelten Lösungsmitteln sind in Abbildung 49 dargestellt. Die ASE allein führt zur geringsten Beeinflussung des permanenten CBX-Signals. Ursache könnten aus dem Dispersionsmaterial, der Diatomenerde (Isolute HM-N), extrahierte Störsubstanzen sein. In Kombination mit der Oasis HLB SPE oder nur mit der SPE sind zusätzliche Signaleinbrüche und -verstärkungen zu beobachten. Auch die beiden Elutionsfraktionen der SPE (F1 und F2) unterscheiden sich in ihrem Matrixeffekt. Die Signaleinbrüche liegen außerhalb des Retentionsbereiches der Analyten. Jedoch tritt eine peakartige Signalverstärkung bei der zweiten SPE-Fraktion nahe der Retentionszeit von OQX auf. Eine Beeinflussung des OQX-Signals ist im Fall von chromatographischen Schwankungen durchaus denkbar.

### 4.3 Weitere Einflussfaktoren auf den Matrixeffekt

#### 4.3.1 Einfluss des LC-MS/MS-Gerätes

In der Literatur wird auch die Geometrie der Ionisationsquelle, und damit verbundene Unterschiede der Ionisationsmechanismen, als bedeutender Einflussfaktor auf den Matrixeffekt beschrieben [123,127,128]. Aus diesem Grund wurden die mittels SEC-Fraktionierung gereinigten Proben aus Abschnitt 4.1.4 an zwei verschiedenen LC-MS/MS-Geräten gemessen. Neben dem API 4000 QTrap (Turbo V™ Source, orthogonaler Spray-Winkel) kam zum Vergleich ein TSQ Vantage Triple Quadrupol LC-MS/MS (Ion Max API Source, 60 ° Spray-Winkel) zum Einsatz.

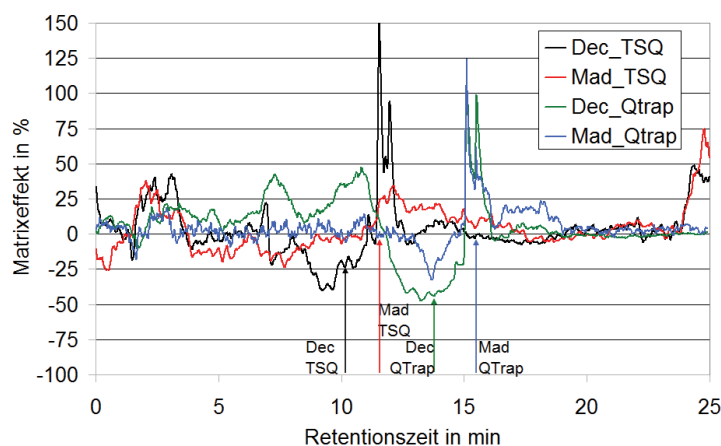
Die Matrixeffekte weisen bei dem Großteil der Analyten und Fraktionen den gleichen Trend auf. Es sind jedoch Unterschiede in der Ausprägung des Matrixeinflusses erkennbar. Im mittleren Retentionsbereich ist der Matrixeffekt bei der Messung mit dem TSQ Vantage stärker ausgeprägt. Die Signale der früh- und späteluiierenden Kokzidiostatika werden am TSQ Vantage weniger stark unterdrückt.



**Abbildung 50:** Matrixeffekte an verschiedenen LC-MS/MS-Geräten (4000 QTrap und TSQ Vantage) auf ausgewählte Kokzidiostatika in SEC-fraktioniertem Futtermittel-extrakt mit und ohne vorherige dSPE

### Postcolumn infusion

Der Einfluss des LC-MS/MS-Gerätes auf das Matrixeffektprofil wird anhand von Decoquinat und Maduramicin in Abbildung 51 verglichen. Hierbei ist zu beachten, dass trotz gleicher Trennsäule und Fließmittel an den beiden HPLC-Geräten eine Retentionszeitverschiebung von ca. drei Minuten besteht. Durch unterschiedliche Totvolumina lässt sich diese Verschiebung kaum erklären, und wurde daher für den Vergleich der Systeme hingenommen. Die Matrixeffektprofile von Decoquinat haben den gleichen Verlauf, so dass lediglich eine Verschiebung auf der Retentionszeitachse vorliegt. An beiden Geräten wird das Decoquinat-Signal zu seiner Retentionszeit unterdrückt. Im Gegensatz dazu wird das Signal von Maduramicin an beiden LC-MS/MS verstärkt. Dies widerspricht den Ergebnissen der post extraction addition, bei der für Maduramicin Signalsuppression nachgewiesen wurde. Außerdem sind, im Unterschied zu Decoquinat, die an beiden Geräten ermittelten Matrixeffektprofile für Maduramicin verschieden. Für Maduramicin ist der markante Bereich der Signalverstärkung von 11 bis 13 min (siehe Abbildung 51 Verlauf Dec\_TSQ) bei der Messung am TSQ Vantage nicht vorhanden.



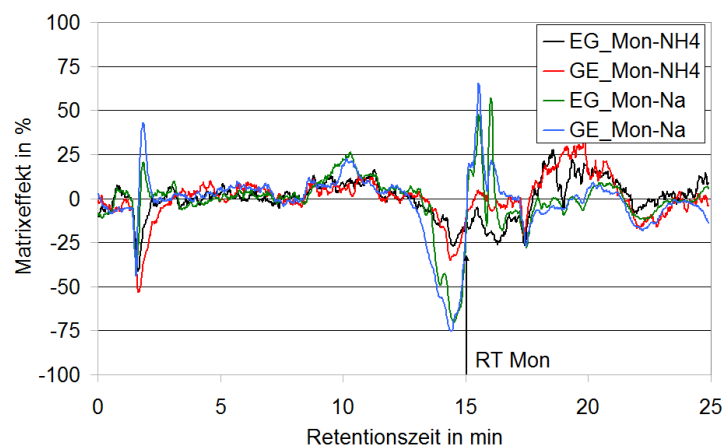
**Abbildung 51:** Matrixeffektprofile von Decoquinat und Maduramicin in SEC-fraktioniertem Futtermittlextrakt gemessen an zwei LC-MS/MS-Geräten (API 4000 QTrap und TSQ Vantage)

Der Trend der Matrixeffekte stimmt zwischen den verwendeten LC-MS/MS-Geräten überein, die Ausprägung der Suppressions- und Verstärkungsbereiche unterschied sich jedoch leicht. Im Allgemeinen waren mit den verschiedenen Quellgeometrien ähnliche Effekte zu beobachten.

#### 4.3.2 Einfluss der MS-Messbedingungen am Beispiel des gewählten Molekül-Addukt-Ions - Vergleich der $[M+NH_4]^+$ - und $[M+Na]^+$ -Precursor-Ionen

Im Rahmen der Methodenentwicklung war geprüft worden, welche Addukt-Ionen der Ionophore als Vorläufer-Ionen zu empfindlicheren MRM-Signalen führten. Dazu wurden die Natrium- und die Ammonium-Addukte als Vorläufer-Ionen verglichen, wobei letztere die intensiveren Signale lieferten. Im folgenden Versuch wurde mittels PCI der Einfluss der Matrix auf die verschiedenen Addukte der ionophoren Kokzidiostatika verglichen. Die Matrices Eigelb und Gesamtei wurden dabei untersucht. Unter Verwendung der optimierten Massenübergänge unterschieden sich die Matrixeffekte der Natrium-Addukte von denen der Ammonium-Addukte aller ionophoren Kokzidiostatika. Abbildung 52 zeigt die Matrixeffektprofile des Monensin-Natrium-Adduktes und des Monensin-Ammonium-Adduktes in Eigelb und Gesamtei.

Die Natrium-Addukt-Signale werden im Retentionsbereich von 13 bis 15 min deutlich stärker unterdrückt als die Ammonium-Addukt-Signale. Im 15 bis 17 min werden die Signale des Ammonium-Adduktes verstärkt, während die des Natrium-Adduktes kaum beeinflusst werden. Die Messung der Ammonium-Addukte führt also nicht nur zu intensiveren Signalen, sondern ist auch deutlich weniger von Matrixeffekten betroffen als die Messung der Natrium-Addukte. Zur Retentionszeit von Monensin (15,0 min) tritt eine abrupte Änderung des Matrixeffektes von Suppression zu Verstärkung auf. Solche Schwankungen des Matrixeffektes im Retentionsbereich einer Substanz sind als

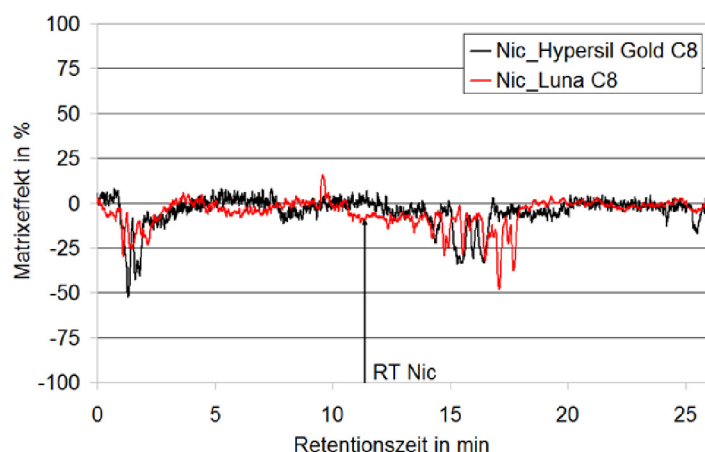


**Abbildung 52:** Matrixeffektprofile von Monensin gemessen als Ammonium-Addukt und als Natrium-Addukt in Eigelb- und Gesamteiextrakt

ungünstig für die Präzision einer Messmethode anzusehen. Das vorliegende Beispiel zeigt, dass geringe Retentionszeitschwankungen dazu führen können, dass das  $[M+Na]^+$ -Signal von Monensin merklich unterdrückt oder verstärkt wird. Für die Analytik von ionophoren Kokzidiostatika, insbesondere für Monensin, mit LC-MS/MS ist die Detektion der Ammonium-Addukte deshalb zu bevorzugen.

#### 4.3.3 Einfluss des Trennsäulenmaterials auf den ermittelten Matrixeffekt

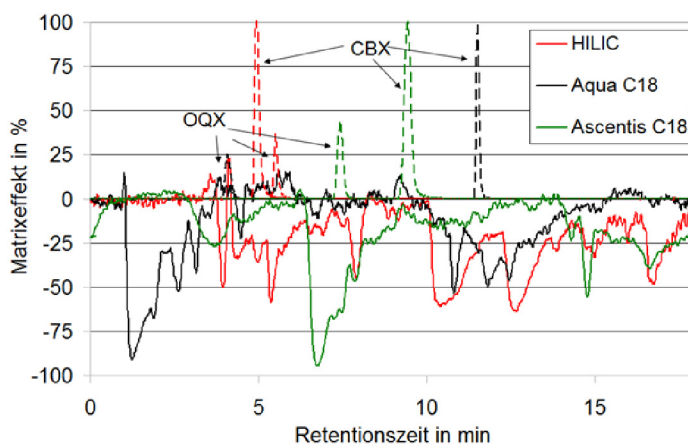
Der Einfluss der stationären Phase der HPLC auf den Matrixeffekt wurde anhand zwei Trennsäulen mit verschiedenen C8-Materialien geprüft.



**Abbildung 53:** Matrixeffektprofile von Nicarbazin in Gesamteiextrakt nach dSPE unter Verwendung verschiedenen C8-HPLC-Säulen (Hypersil Gold, Luna)

Die RP8-Säulen hatten die gleiche Länge, Durchmesser und Partikelgröße, stammten aber von verschiedenen Herstellern. Der Unterschied zwischen den Säulen bestand ausschließlich im Packungsmaterial. In Abbildung 53 sind die Matrixeffektprofile von Nicarbazin in Gesamtei nach Reinigung mit dispersiver SPE gegenübergestellt. Der Verlauf der Matrixeffektprofile ist ähnlich, beide weisen einen Bereich der Signalsuppression von 14 bis 18 Minuten auf. Die Signaleinbrüche sind auf der Hypersil Gold-Säule relativ breit, auf der Luna-Säule hingegen schmal und größtenteils stärker ausgeprägt. Zur Retentionszeit von Nicarbazin hat der Wechsel des Trennsäulenmaterials kaum Einfluss auf den Matrixeffekt.

Die Matrixeffektprofile von CBX in Futtermittlextrakt (ASE mit Acetonitril + 2 % Ameisensäure) auf verschiedenen C18-Säulen (Abbildung 54) weisen eine deutliche Verschiebung auf der Retentionszeitachse auf. Ursache dafür sind die unterschiedlichen Partikeltechnologien, auf welchen die stationären Phasen der beiden Säulen basieren. Während die Aqua-Säule konventionelles Kieselgelmateriale enthält, wird bei der Ascentis Express Säule ein Material mit massivem Kern und poröser Hülle (core shell) verwendet. Dies hat auch erheblichen Einfluss auf die Retentionszeit der Analyten. Auf der Aqua-Säule ist der Einfluss der Matrix zur Retentionszeit von CBX und OQX deshalb entgegengesetzt zu dem auf der Ascentis-Säule.



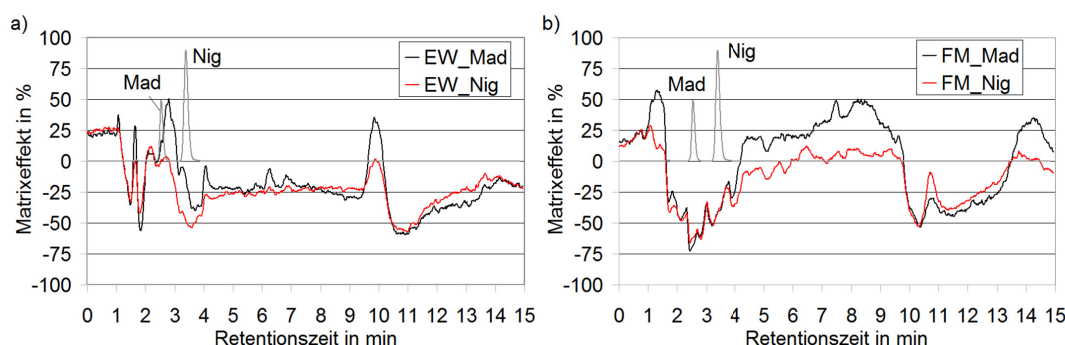
**Abbildung 54:** Matrixeffektprofile von CBX in Futtermittlextrakt (ASE mit Acetonitril + 2 % Ameisensäure) unter Verwendung verschiedener HPLC-Säulen (Ascentis Express C18, Luna Aqua C18 und Luna HILIC)

Unter Verwendung der HILIC-Säule, welche auf einem anderen chromatographischen Trennprinzip basiert, eluieren CBX und OQX in einem engeren Retentionsbereich. Das Matrixeffektprofil zeigt eine ähnliche starke Signalunterdrückung zu beiden Retentionszeiten. Insgesamt sind auf der HILIC-Säule häufige Änderungen des Matrixeffektes zu beobachten. Besonders im Retentionsbereich der Analyten kann sich dies auf die Messpräzision auswirken. Der Vergleich der drei Säulen zeigt, dass eine Reduktion des Matrixeffektes durch Änderung der chromatographischen Bedingungen für CBX und OQX möglich ist.

#### 4.3.4 Interne Standardsubstanzen zur Korrektur von Matrixeffekten – strukturverwandte oder isotoopenmarkierte interne Standards?

Interne Standardsubstanzen werden verwendet, um Verluste bei der Probenaufarbeitung und Matrixeffekte auszugleichen. Am besten geeignet sind stabilisotopenmarkierte, z. b. deuterierte oder  $^{13}\text{C}$ -markierte Formen der untersuchten Analyten. Sind stabilisotopenmarkierte Standards nicht verfügbar, kann auch auf Substanzen mit ähnlicher Struktur zurückgegriffen werden. Die Voraussetzung ist immer, dass sich der Analyt und der interne Standard gleich verhalten. Theoretisch sollten die stabilisotopenmarkierten Substanzen diese Bedingung erfüllen. Geringe Retentionszeitverschiebungen sind in Abhängigkeit von der Art der Markierung möglich. Lindegardh et al. [129] konnten jedoch zeigen, dass in bestimmten Situationen der deuterierte interne Standard nicht zur Korrektur von Matrixeffekten verwendet werden kann. Anhand des Matrixeffektprofils wurde deutlich, dass die durch die Deuterierung verursachte Retentionszeitverschiebung des internen Standards dazu führte, dass Analyt und interner Standard unterschiedlich von der Matrix beeinflusst wurden.

In der vorliegenden Arbeit stand für die ionophoren Kokzidiostatika nur das strukturverwandte Nigericin als interner Standard zur Verfügung. Ein identisches Verhalten der Analyten und des internen Standards ist daher nicht unbedingt zu erwarten. Die Matrixeffektprofile von Maduramicin und Nigericin in Eiweiß und Futtermittel (Abbildung 55) belegen ein abweichendes Verhalten von Analyt und internem Standard unter Einfluss der beiden Matrices.

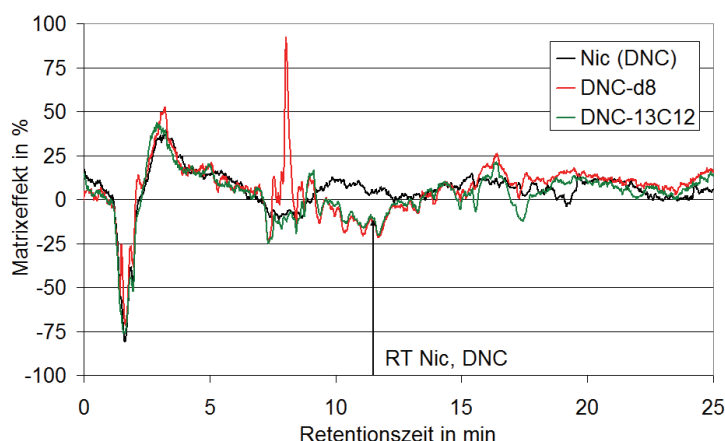


**Abbildung 55:** Matrixeffektprofile von Maduramicin und Nigericin in Eiweiß- (a) und Futtermittel- (b) extrakt (Extraktion mit Acetonitril mit 2 % Ameisensäure)

Beim Eiweiß treten die Unterschiede im Retentionszeitbereich von Maduramicin und Nigericin auf. Auffällig sind die schnellen Wechsel zwischen Signalverstärkung und -unterdrückung besonders im ersten Drittel des Chromatogramms. Dies muss nicht zwangsläufig zur Beeinträchtigung der Analysenergebnisse führen, sofern der Matrixeffekt stabil ist. Die Elution Maduramicins in der Flanke des Matrixeffektpeaks zur Retentionszeit von 3 min kann jedoch schwankende Matrixeffekte zur Folge haben. Kleinste Veränderungen im chromatographischen System können zu Abweichungen des Matrixeffektes auf Maduramicin zwischen den Messungen einer Probenserie führen und damit

die Messpräzision beeinträchtigen. Im Futtermittel verlaufen die Matrixeffektprofile zur Retentionszeit von Analyt und internem Standard gleich.

Für drei chemische Kokzidiostatika standen deuterierte interne Standards zur Verfügung. Für Nicarbazin, welches als Dinitrocarbanilid detektiert wird, waren sowohl ein deuterierter als auch ein  $^{13}\text{C}$ -markierter Standard verfügbar. Die stabilisotopenmarkierten Substanzen waren ebenfalls Bestandteil des Standard-Mix für die PCI-Experimente. In den meisten Fällen lagen für Analyt und den markierten internen Standard identische Matrixeffektprofile vor. Bei dem in Abbildung 56 dargestellten Beispiel wurden jedoch abweichende Profile von Analyt und internem Standard gemessen.



**Abbildung 56:** Matrixeffektprofile von Nicarbazin und den internen Standards Dinitrocarbanilid- $\text{d}_8$  und Dinitrocarbanilid- $^{13}\text{C}_{12}$  in Futtermittelsextrakt (Acetonitril)

Das Signal von DNC- $\text{d}_8$  wurde bei etwa 8 min um etwa 90 % verstärkt, während Nicarbazin (DNC) und DNC- $^{13}\text{C}_{12}$  kaum von der Matrix beeinflusst wurden. Zur Retentionszeit von Dinitrocarbanilid bei 11,5 min hatte dies keine Auswirkungen. Das Beispiel zeigt jedoch, dass sich isotopenmarkierte Substanzen nicht immer exakt wie deren unmarkierte Form verhalten müssen. Deuterierte Standards sind davon häufiger betroffen als beispielsweise  $^{13}\text{C}$ -,  $^{15}\text{N}$ - oder  $^{17}\text{O}$ -markierte Substanzen, wie auch die Arbeitsgruppen von Stokvis [152] und Wang [153] zeigten. Die Unterschiede der physikalischen Eigenschaften zwischen  $^{12}\text{C}$  und  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$  und  $^{15}\text{N}$  sowie  $^{16}\text{O}$  und  $^{17}\text{O}$  sind geringer als die zwischen Wasserstoff und Deuterium. Durch den Austausch von kohlenstoffgebundenem Wasserstoff gegen Deuterium verändert sich die Lipophilität des Moleküls, was zu der beschriebenen Retentionszeitverschiebung führt.

#### 4.4 Matrixeffektuntersuchungen – Aussagekraft und Vergleichbarkeit der Methoden

Zur Untersuchung der Matrixeffekte wurden in der vorliegenden Arbeit die beiden Techniken post extraction addition und post column infusion angewendet. Dabei handelt es sich um die in der Literatur am häufigsten verwendeten Methoden. Die Ergebnisse bei-

der Techniken wurden im Laufe der Untersuchungen immer wieder verglichen. In der Mehrzahl der Fälle wiesen die ermittelten Matrixeffekte den gleichen Trend hinsichtlich Suppression bzw. Enhancement auf. Selten stimmte jedoch der mittels post extraction addition ermittelte Matrixeffekt mit dem zur Retentionszeit des Analyten im Matrixeffektprofil vorliegenden Wert überein. Der grundsätzliche Unterschied der Methoden liegt darin, dass der Analyt die chromatographische Säule gemeinsam mit der Matrix passiert bzw. erst nach der chromatographischen Trennung der Probe auf die Matrix trifft. Mit der PCI wurde häufiger Signalerhöhung zur Retentionszeit der Analyten beobachtet als mit der post extraction addition. Meist wurden in diesen Fällen gegensätzliche Matrixeffekte mit den beiden Techniken beobachtet. Ein Beispiel sind die Matrixeffekte eines Futtermittelextraktes auf Maduramicin gemessen am API 4000 QTrap mit PEA (in Abbildung 50) und mit PCI (in Abbildung 51).

Nachteil beider Methoden ist die fehlende Wechselwirkung von Analyt und Matrix während der Probenaufarbeitung. Die dabei ablaufenden Prozesse können den Analyten beeinflussen. Die Bedingungen wie z. B. der pH-Wert oder die Ionenstärke während der Aufarbeitung können beispielsweise zu Dimerisierung, Isomerisierung oder zu anderen Reaktionen des Analyten führen. Bei der Messung im MRM-Modus gehen derartige Addukte für die Detektion verloren. Konkurrenzvorgänge zwischen Probe und Analyt werden nicht berücksichtigt. Beide Untersuchungsmethoden stellen Modelle einer Analyse dar, weshalb die Ergebnisse kritisch zu beurteilen sind. Dennoch ermöglichen sie eine tendenzielle Einschätzung über den Einfluss des Probenmaterials auf die Analyse einer bestimmten Substanz.

### 4.5 Reduktion von und Umgang mit Matrixeffekten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Aufreinigung von Probenextrakten Matrixeffekte reduzieren, zum Teil aber auch verstärken kann. Eine einfache Methode zur Reduktion des Matrixeinflusses ist die Verdünnung der Extrakte, sofern die Konzentration der Analyten dafür ausreichend ist. Unter Umständen kann der Wechsel des LC-MS/MS-Systems eine Möglichkeit zum Umgehen von Matrixeffekten sein. Insbesondere die Geometrie der Ionisationsquelle kann einen Einfluss auf den Matrixeffekt haben. Diese Aussagen aus der Literatur wurden durch die Ergebnisse in 4.3.1 bestätigt. Eine generelle Aussage, welche Ionenquelle für welche Analyt-Matrix-Kombination am besten geeignet ist, kann nicht getroffen werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Verminderung von Matrixeffekten ist die Reduktion des HPLC-Flusses, z.B. bei der nano-flow LC. Bei Flussraten im nl/min-Bereich ist die Effizienz der Electrospray Ionisation im Vergleich zu konventionellen Werten zwischen 200 und 1000  $\mu\text{l}/\text{min}$  deutlich erhöht [154]. Die Ursache ist zum einen, dass aufgrund der geringeren Tröpfchengröße weniger Lösungsmittel verdampft werden muss und damit die Konzentration von Analyt- und Matrixmolekülen im Tropfen niedriger ist. Zum anderen ist, vor allem im Falle von nicht-oberflächenaktiven Analyten, das erhöhte Verhältnis der Oberfläche zum Volumen der nano-ESI-Tröpfchen Grund für eine erhöhte Ionisationsrate der Analyten. Im Nano-Spray gelangen diese leicht an die Tropfenoberfläche und können ionisiert werden. Bei konventioneller ESI werden eher oberflächenaktive Substanzen in



die kleineren geladenen Tröpfchen abgegeben, während nicht-oberflächenaktive Substanzen im ungeladenen Resttropfen zurückbleiben [155].

Sind Matrixeffekte bei der Analyse unvermeidbar, können diese bei der Quantifizierung über eine Matrixkalibrierung möglicherweise ausgeglichen werden. In der Literatur werden verschiedene Möglichkeiten der Matrixkalibrierung diskutiert, einige davon wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die einfachste Form einer Matrixkalibrierung ist die Korrektur des Anstiegs einer Standardkalibrierung um den Responsefaktor, der sich aus dem Response eines dotierten Probenextraktes gegenüber dem entsprechenden Standard in Lösungsmittel ergibt. Eine zweite Möglichkeit ist die Variante der matrix matched standards, bei der alle Kalibrationslevel in einem dem Probenmaterial entsprechenden Blankextrakt gelöst sind. Damit können die Ergebnisse der Analyse ausschließlich um den Matrixeffekt korrigiert werden. Im Vergleich dazu berücksichtigt die echte Matrixkalibrierung, bei der alle Kalibrierstufen exakt wie die Proben behandelt werden, zusätzlich die Aufarbeitungsverluste. Voraussetzung für diese Quantifizierungsmethoden ist die Verfügbarkeit von Blankmaterial, das der Probe genau entspricht. Je nach erwarteter Konzentration in den Proben können auch große Mengen an Standardlösung zur Dotierung des Blankmaterials erforderlich sein. Bei sehr niedrigen Konzentrationen, die an die Grenzen der Leistungsfähigkeit der Methode stoßen, kann mit der Standardadditionsmethode quantifiziert werden. Diese Methode ist jedoch zeit- und materialaufwendig, da jede Probe in verschiedenen Konzentrationen aufgestockt und anschließend aufgearbeitet werden muss. Es bleibt zu beachten, dass keine der Dotierungsmethoden eventuelle kovalente Bindungen von Matrix und Analyten berücksichtigt.

Die Verwendung interner Standardsubstanzen kann ebenfalls zum Ausgleich von Matrixeffekten und damit zur Verbesserung der quantitativen Analyse beitragen. Wie in Kapitel 4.3.4 diskutiert wurde, sind isotoopenmarkierte Standards nicht für jeden Analyten verfügbar. Sie sind dazu geeignet Aufarbeitungsverluste auszugleichen, stellen aber keine Garantie für die Korrektur von Matrixeffekten. In der vorliegenden Arbeit wurden Ergebnisse von Stokvis [152] und Wang [153] im Hinblick die auf bessere Eignung von  $^{13}\text{C}$ -markierten gegenüber deuterierten internen Standards bestätigt.

Ausführliche Matrixeffektuntersuchungen in der Pestizidanalytik zeigten, dass für eine Gruppe strukturverwandter Pestizide ein Vertreter als Monitorsubstanz zur Korrektur der scheinbaren Wiederfindung dienen kann. Grundlage dafür ist die Hypothese, dass die Matrixbestandteile größeren Einfluss auf den Matrixeffekt haben als der Analyt. Stahnke et al. [142] zeigten, dass die Matrixeffektprofile der meisten Pestizide in einer bestimmten Matrix ähnlich verlaufen. Anhand des Matrixeffektprofils einer Monitorsubstanz in einem bestimmten Probenmaterial wurde der Matrixeffekt zur jeweiligen Retentionszeit aller 140 mit der Methode gemessenen Analyten bestimmt. Das Signal jedes Analyten wurde um den zur entsprechenden Retentionszeit ermittelten Matrixeffekt der Monitorsubstanz korrigiert. Für die Mehrzahl der untersuchten Pestizide führte dies zu einer deutlichen Erhöhung der Wiederfindung in dotierten Proben. Für die entwickelte Kokzidiostatika-Multimethode kann eine solche Korrektur nicht vorgenommen werden. Die durch Dotierung von Extrakten und durch Nachsäuleninfusion ermittelten Matrixeffekte wichen zum Teil stark voneinander ab. Zudem wären mindestens zwei Monitorsubstanzen erforderlich, um fünf chemische und sechs ionophore Kokzidiostatika

abzudecken. Der Aufwand wäre im Verhältnis zu der Studie mit 140 Pestiziden zu hoch.

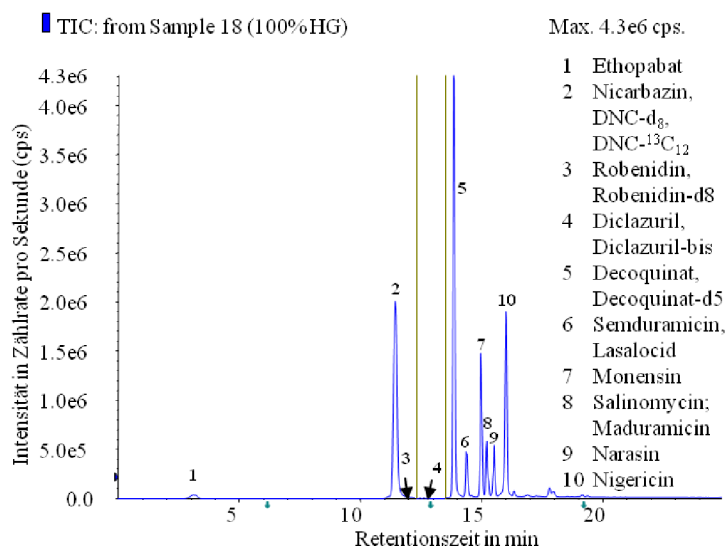
Die postcolumn infusion wird auch als Alternative für einen internen Standard eingesetzt. Eine strukturverwandte oder stabilisotopenmarkierte Substanz wird dabei kontinuierlich während der quantitativen Messung infundiert. Damit ist der Matrixeffekt auf den internen Standard über den gesamten chromatographischen Lauf bekannt und wird zur Korrektur des Analytsignals zu dessen Retentionszeit verwendet.

Ebenfalls in der Analytik von Pestiziden wurde die ECHO-Technik zum Ausgleich von Matrixeffekten bei der ESI- und APCI-MS/MS angewendet [156]. Innerhalb einer Messung wurden eine Referenzsubstanz und der Probenextrakt kurz nacheinander injiziert. Die Elution beider Signale in einem möglichst kurzen Zeitraum sollte für eine möglichst gleichstarke Beeinflussung durch die Matrix sorgen. Die Methode erleichtert zwar das Screening der Überschreitung von Pestizid-Höchstgehalten, eine zuverlässige Quantifizierung garantiert sie jedoch nicht. Die Anwendbarkeit in der vorliegenden Arbeit ist zudem fraglich, da anhand der Matrixeffektprofile gezeigt wurde, dass sich der Einfluss der Matrix innerhalb eines kurzen Retentionszeitraums abrupt ändern und z.B. von Suppression zu Verstärkung wechseln kann. Unter ungünstigen Bedingungen wären ECHO-Peak und Proben-Peak gegensätzlichen Matrixeffekten unterworfen.

Die Matrixeffektuntersuchungen in dieser Arbeit zeigen, dass die ermittelten Matrixeffektwerte Anhaltspunkte geben können, welchen Einfluss ein bestimmtes Probenmaterial oder auch Substanzen exogenen Ursprungs auf das Signal eines Analyten haben können. Mit den Ergebnissen aus diesen Untersuchungen können die Gegebenheiten bei der Analyse einer unbekannten Probe aber nur abgeschätzt werden. Diese Untersuchungen sind vor allem dazu geeignet, Matrixeffekte im Rahmen der Methodenentwicklung zu erkennen und gegebenenfalls zu reduzieren. Es wurde gezeigt, dass gerade bei der Entwicklung von Multimethoden kein generelles Konzept zur Reduktion von Matrixeffekten existiert.

#### 4.6 Validierung der Multimethode zur Bestimmung von 11 Kokzidiostatika zur Kontrolle der Höchstgehalte für die Verschleppung in Futtermittel für Nicht-Zieltierarten

Für die Kontrolle der in RL 2009/8/EG festgelegten Höchstgehalte (HG) für die durch unvermeidbare Verschleppung in Futtermittel für Nichtzieltierarten vorhandenen Kokzidiostatika wurde eine Multimethode entwickelt und validiert. Um einen hohen Probendurchsatz in der amtlichen Kontrolle zu ermöglichen, sollte die Methode möglichst einfach sein. Aus diesem Grund und auf Basis der Ergebnisse der Matrixeffektuntersuchungen wurde kein Clean-up-Schritt in die Methode integriert. Zur Reduktion von Pipettier- und Verdünnungsschritten wurde für die Methode eine Mischung der Analyten im Verhältnis ihrer Höchstgehalte (Tabelle 6) etabliert. Abbildung 57 zeigt das LC-MS/MS-Chromatogramm einer in der Konzentration des jeweiligen Höchstgehaltes der Kokzidiostatika dotierten Futtermittelprobe.



**Abbildung 57:** Chromatogramm einer dotierten Futtermittelprobe (Konzentration entspricht den Höchstgehalten aus RL 2009/8/EG)

##### 4.6.1 Überprüfung der Linearität des Arbeitsbereiches

Der durch die Kokzidiostatika-Höchstgehalte vorgegebene Arbeitsbereich der Methode (siehe Matrixkalibrierreihe Tabelle 7) wurde anhand der Reststandardabweichungen der Kalibrierfunktionen 1. und 2. Ordnung und durch den Mandel-Anpassungstest überprüft. Die Reststandardabweichungen der Kalibrierfunktionen 1. und 2. Ordnung liegen für alle Analyten in der gleichen Größenordnung (s. Tabelle 8).

Dies erlaubt keine eindeutige Aussage über die Linearität, sodass die Ermittlung der Linearität des Arbeitsbereiches anhand des Mandel-Anpassungstests erfolgen muss. Ist bei dem sich dahinter verbergenden F-Test die Prüfgröße kleiner als der Tabellenwert, so

**Tabelle 8:** Linearität des Arbeitsbereiches\* der Kokzidiostatika-Multimethode (Reststandardabweichung der Kalibrierfunktionen 1. und 2. Ordnung, Mandel-Anpassungstest)

Analyt	Reststandardabweichung der Kalibrierfunktion		Prüfgröße F (Mandel-Anpassungstest) (kritischer F-Wert=13,75)
	1. Ordnung	2. Ordnung	
Ethopabat	18642	19689	0,28
Robenidin	0,0354	0,0332	1,98
Nicarbazin (DNC-d <sub>8</sub> )	0,2103	0,1611	5,93
Nicarbazin (DNC- <sup>13</sup> C <sub>12</sub> )	0,0203	0,0215	0,26
Diclazuril	0,0514	0,0494	1,58
Decoquinat	0,0132	0,0141	0,09
Semduramicin	0,0012	0,0013	0,14
Lasalocid	0,0143	0,0120	3,98
Salinomycin	0,0207	0,0129	11,96
Narasin	0,0091	0,0093	0,71
Monensin	0,0523	0,0560	0,10
Maduramicin	0,0007	0,0007	0,81

\* Arbeitsbereich: 20 % - 160 % des HG des jeweiligen Kokzidiostatikums

ist die Anpassung durch die Kalibrierfunktion 1. Ordnung signifikant besser als die der Funktion 2. Ordnung, und der Kalibrierbereich ist linear. Die Daten zur Beurteilung der Linearität des Arbeitsbereiches sind in Tabelle 8 aufgelistet. Der F-Test ergab, dass für alle Kalibrierreihen die lineare Funktion bzw. die Funktion 1. Ordnung zur Quantifizierung angewendet werden kann, da die berechneten Prüfgrößen kleiner als der kritische F-Wert sind.

Zur Quantifizierung der Kokzidiostatika in den für die Validierung dotierten Futtermittelproben wurde die in Tabelle 7 beschriebene Matrixkalibrierreihe verwendet. Für alle Analyten bis auf Ethopabat wurde die Korrektur gegen den zugehörigen internen Standard durchgeführt.

#### 4.6.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Ein Kriterium für die erfolgreiche Validierung der Multimethode bestand darin, dass die Bestimmungsgrenzen unterhalb der jeweiligen Höchstgehalte liegen. Die nach der Kalibriergeradenmethode nach der DIN ISO 32645 ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und die Bestimmtheitsmaße der entsprechenden Matrixkalibriergeraden von 0 % bis 160 % der Höchstgehalte sind in Tabelle 9 aufgelistet. Die Nachweisgrenzen liegen zwischen 6 §§ und 30 % des zugehörigen Höchstgehaltes. Alle Bestimmungsgrenzen bei einem Kalibrierbereich von 0 % bis 160 % der Höchstgehalte liegen unterhalb des entsprechenden Höchstgehaltes. Eine Überschreitung der Höchstgehalte kann also mit der vorliegenden Multimethode nachgewiesen werden. Die tatsächlichen Nachweisgrenzen der Methode sind deutlich niedriger. Diese wurden nicht ermittelt, da der

Arbeitsbereich durch die zu überwachenden Höchstgehalte festgelegt ist.

**Tabelle 9:** Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Kokzidiostatika-Multimethode nach DIN ISO 32645 (Kalibriergeradenmethode) [144]

Analyt	Nachweisgrenze in		Bestimmungsgrenze in		Bestimmtheitsmaß der Matrixkalibriergeraden	HG (µg/kg)
	µg/kg	% HG	µg/kg	% HG		
Ethopabat	39,5	-	106,7	-	0,9989	-
Robenidin	39,8	5,7	115,0	16,4	0,9994	700
Nicarbazin	44,4	8,9	125,7	25,1	0,9986	500
Diclazuril	1,1	11,0	3,0	30,0	0,9980	10
Semduramicin	68,6	27,4	184,8	73,9	0,9820	700
Salinomycin	116,9	16,7	320,1	45,7	0,9952	1250
Narasin	133,3	19,0	362,6	51,8	0,9938	50
Monensin	331,7	26,5	893,7	71,5	0,9880	1250
Maduramicin	14,0	28,0	37,8	75,6	0,9866	400
Lasalocid	374,9	30,0	1112,1	89,0	0,9826	700
Decoquinat	37,6	9,4	106,2	56,6	0,9985	250

#### 4.6.3 Wiederfindung und Präzision

Die nach Formel (15) ermittelten Wiederfindungsraten (WFR) für die drei Dotierungen (80 %, 100 % und 110 % des Höchstgehaltes) sind in Tabelle 10 dargestellt. Mit Werten zwischen 86 % und 107 % sind die Wiederfindungsraten zufriedenstellend. Die Beurteilung der Wiederfindungsraten erfolgte anhand Kapitel 2.3.2.1 der Entscheidung 2002/657EG bezüglich der Richtigkeit von quantitativen Methoden. Die dort in Abhängigkeit von der Konzentration des Analyten akzeptierten Abweichungen können auf die Wiederfindung von zugesetzten bekannten Mengen des Analyten angewendet werden, sofern kein zertifiziertes Referenzmaterial zur Verfügung steht.

Die bei diesem Versuch auftretenden Abweichungen vom jeweiligen Mittelwert stehen für die Präzision der Methode unter Wiederholbedingungen. Die Intraday-Variationskoeffizienten wurden berechnet und in Tabelle 11 dargestellt. Bei den chemischen Kokzidiostatika sind die Variationskoeffizienten etwas niedriger und somit die Präzision etwas besser als für die Ionophore. Dabei ist keine Systematik in Abhängigkeit von der Retentionszeit und der Konzentration der Analyten erkennbar.

**Tabelle 10:** Mittlere Wiederfindungsraten der Kokzidiostatika-Multimethode in dotiertem Futtermittel bei 80 %, 100 % und 110 % des HG (n=5)

Analyt	bei 80 % HG		bei 100 % HG		bei 110 % HG	
	MW (µg/kg)	WFR (%)	MW (µg/kg)	WFR (%)	MW (µg/kg)	WFR (%)
Ethopabat*	420,8	105,2	529,5	105,9	579,4	105,3
Robenidin	585,6	104,6	731,2	104,5	793,7	103,1
Nicarbazin	392,5	98,1	513,8	102,8	542,4	98,6
Diclazuril	8,0	100,2	9,7	96,9	10,6	96,2
Semduramicin	187,5	93,8	246,5	98,6	277,1	100,8
Salinomycin	566,7	101,2	718,5	102,6	811,9	105,4
Narasin	528,5	94,4	637,9	91,1	779,2	101,2
Monensin	1001,7	100,2	1131,0	90,5	1186,9	86,3
Maduramicin	42,6	106,4	48,5	97,0	50,8	92,3
Lasalocid	1065,5	106,5	1261,0	100,9	1475,8	107,3
Decoquinat	329,2	102,9	410,0	102,5	447,7	101,7

\* kein HG für Ethopabat, Konzentration wurde von Nicarbazin übernommen

**Tabelle 11:** Präzision der Multimethode unter Wiederholbedingungen - Intraday-Variationskoeffizienten in dotiertem Futtermittel (80 %, 100 % und 110 % der HG\*), n=5

Analyt	Intraday-Variationskoeffizient in %		
	bei 80 % HG	bei 100 % HG	bei 110 % HG
Ethopabat	2,4	4,3	4,1
Robenidin	1,6	3,2	1,8
Nicarbazin	4,2	4,9	10,9
Diclazuril	5,0	4,1	3,2
Semduramicin	10,5	7,3	5,1
Salinomycin	3,0	10,8	3,7
Narasin	5,6	8,2	13,2
Monensin	10,6	8,6	9,8
Maduramicin	5,5	3,5	6,5
Lasalocid	9,0	6,6	7,9
Decoquinat	1,5	3,5	1,9

\* HG (Höchstgehalte) siehe Tabelle 2

In der Entscheidung der Kommission 2002/657/EG sind Kriterien für die Präzision einer quantitativen Analysenmethode vorgegeben. Der dort festgelegte maximal akzeptable Variationskoeffizient bei mehrfacher Analyse einer Probe in verschiedenen Laboratorien

unter Reproduzierbarkeitsbedingungen basiert auf der Horwitz-Gleichung (Formel (16)).

$$Var_{koeff} = 2^{(1-0,5 \cdot \log c)} \quad (16)$$

c...Massenanteil ausgedrückt als Zehnerpotenz

Für die laborinterne Präzision unter Wiederholbedingungen sollten die Hälfte bzw. Zwei Drittel dieses Variationskoeffizienten nicht überschritten werden. Bei einer Konzentration von 100 µg/kg entspricht dies Variationskoeffizienten von 11,5 % bis 15,3 %, bei 1000 µg/kg 8 % bis 10,7 %. Für Konzentrationen unter 100 µg/kg ergibt die Gleichung extrem hohe Werte, weshalb in der Entscheidung keine konkreten Werte festgelegt wurden. Die Variationskoeffizienten sollen möglichst klein sein. Die ermittelten Intraday-Variationskoeffizienten erfüllen diese Kriterien. Die Präzision der Methode unter Zwischenbedingungen wurde durch fünffache Aufarbeitung dotierter Proben an zwei verschiedenen Tagen bestimmt. Die Interday-Variationskoeffizienten wurden dazu aus den 10 Messwerten (je 5 Messungen pro Tag) pro Analyt und Konzentrationslevel berechnet und in Tabelle 12 aufgelistet.

**Tabelle 12:** Präzision der Multimethode unter Zwischenbedingungen - interday-Variationskoeffizienten in dotiertem Futtermittel (80%, 100 % und 110 % der Höchstgehalte\*), n=5, 2 Tage

Analyt	Interday-Variationskoeffizient in %		
	bei 80 % HG	bei 100 % HG	bei 110 % HG
Ethopabat	4,1	5,4	5,6
Robenidin	5,6	7,1	7,2
Nicarbazin	3,9	6,0	7,7
Diclazuril	4,5	6,9	3,8
Semduramicin	8,3	7,3	15,2
Salinomycin	4,8	8,2	7,1
Narasin	9,5	15,1	10,1
Monensin	8,6	12,2	9,9
Maduramicin	7,5	12,9	8,5
Lasalocid	9,8	14,0	9,4
Decoquinat	1,5	3,0	2,3

Die Variationskoeffizienten zwischen beiden Tagen waren im Allgemeinen größer als innerhalb eines Tages und lagen unterhalb der nach der Horwitz-Gleichung berechneten Maximalwerte. Für die chemischen Kokzidiostatika Nicarbazin, Diclazuril und Decoquinat war die Präzision unter Zwischenbedingungen gleich der Präzision unter Wiederholbedingungen. Die Präzision zwischen zwei Tagen war für die chemischen Kokzidiostatika (1,5 % - 7,7 %) besser als für die ionophoren Kokzidiostatika (4,8 % - 15,2 %).

Die Ergebnisse wurden zusätzlich mittels ANOVA (F-Test) daraufhin überprüft, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den ermittelten Gehalten an zwei verschiedenen Tagen besteht. Die berechneten Prüfgrößen des F-Testes sind in Tabelle 13 aufgelistet.

**Tabelle 13:** Wiederholbarkeit der Kokzidiostatika-Multimethode (F-Test)

Analyt	Prüfgröße F		
	bei 80 % HG	bei 100 % HG	bei 110 % HG
Ethopabat	1,06	5,02	11,70
Robenidin	0,13	1,20	1,10
Nicarbazin	0,17	5,00	0,43
Diclazuril	3,44	0,45	2,93
Semduramicin	2,52	0,08	1,26
Salinomycin	1,28	0,70	0,59
Narasin	0,00	2,98	1,02
Monensin	0,13	4,44	3,12
Maduramicin	1,53	2,32	2,65
Lasalocid	1,26	0,21	0,71
Decoquinat	0,18	0,01	0,06
Kritischer F-Wert	5,32 (bei 2 Gruppen à 5 Werte)		

Die Werte wurden mit dem kritischen F-Wert (5,32) für den Vergleich von jeweils fünf Stichproben aus zwei Gruppen (einfaktorielle Varianzanalyse) bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % verglichen. Ist die berechnete Prüfgröße F kleiner als der kritische F-Wert, ist der Unterschied zwischen beiden Gruppen nicht signifikant.

Für alle Analyten bis auf Ethopabat ist bei allen Konzentrationsstufen die Prüfgröße F kleiner als der kritische F-Wert. Es liegt also kein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen von zwei Tagen vor, und die Multimethode ist somit wiederholbar. Die Variation der Ergebnisse für Ethopabat ist durch das Fehlen eines geeigneten internen Standards zu erklären. Da im Fall von Ethopabat kein Höchstgehalt zu überwachen ist, wurde die unzureichende Wiederholbarkeit akzeptiert.

#### 4.6.4 Robustheit der Methode – Einfluss des Bearbeiters

Die Analysenergebnisse dotierter Futtermittelproben von zwei verschiedenen Bearbeitern wurden zur Prüfung des Einflusses des Bearbeiters auf die Robustheit der Methode mittels F-Test auf signifikante Unterschiede untersucht. Die berechneten Prüfgrößen sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Bei sechs von elf Analyten gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ergebnissen der zwei Bearbeiter. Für Nicarbazin, Narasin und Maduramicin gab es einen signifikanten Unterschied bei einer Konzentrationsstufe, für Robenidin bei zwei und für Ethopabat bei drei Konzentrationen. Es gab keinen Hinweis auf eine Konzentrationsabhängigkeit. Da die Zugabe der Standardlösungen in Form einer Mischung erfolgte, können Bearbeiterfehler als Ursache ausgeschlossen werden. Grund für die Unterschiede sind möglicherweise chromatographische Schwankungen, welche unterschiedlich starke Matrixeffekte innerhalb der Messserie zur Folge hatten.



**Tabelle 14:** Einfluss des Bearbeiters auf die Robustheit der Multimethode (F-Test)

Analyt	Prüfgröße F		
	bei 80 % HG	bei 100 % HG	bei 110 % HG
Ethopabat	10,46	16,38	15,93
Robenidin	7,68	2,30	5,58
Nicarbazin	0,07	8,69	0,36
Diclazuril	0,09	1,53	3,25
Semduramicin	2,01	1,45	1,37
Salinomycin	0,06	0,30	0,99
Narasin	9,39	0,31	0,29
Monensin	0,63	0,01	0,21
Maduramicin	1,90	16,41	3,07
Lasalocid	2,26	0,04	4,10
Decoquinat	2,48	1,84	0,36
Kritischer F-Wert	5,32 (bei 2 Gruppen à 5 Werte)		

#### 4.6.5 Fazit Multimethode

Die entwickelte und validierte Kokzidiostatika-Multimethode zeigt bei den getesteten Parametern für die Mehrzahl der Analyt zufriedenstellende Ergebnisse. Die Wiederfindungsraten sowie Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Methode entsprechen den Anforderungen für eine quantitative Bestimmungsmethode. Bei der Untersuchung der Robustheit war bei einigen Analyten der ermittelte F-Wert größer als der kritische F-Wert. Dies kann durch die unspezifische Probenvorbereitung erklärt werden, die aufgrund der strukturellen Unterschiede der Analyten erforderlich ist. Das kann zur Folge haben, dass störende Bestandteile des Probenmaterials nicht ausreichend durch Extraktion und Chromatographie von den Analyten getrennt werden können. Die Coelution dieser Störsubstanzen mit den Kokzidiostatika führt zur Beeinträchtigung der Signale. Bei konstantem Elutionsverhalten der Matrix können die Matrixeffekte durch interne Standards und die Quantifizierung über Matrixkalibrierungen ausgeglichen werden.

Unter diesen Bedingungen ist die entwickelte Multimethode ein leistungsfähiges Werkzeug zum Screening im Rahmen der Kontrolle der Höchstgehalte von Verschleppungen von Kokzidiostatika in Futtermittel für Nicht-Zieltierarten. Für die Quantifizierung einzelner Analyten sollte die Methode für den jeweiligen Analyten optimiert werden, insbesondere im Hinblick auf den Parameter Robustheit. Grundvoraussetzung für die umfangreiche Fütterungsstudie im zweiten Teil der Dissertation war eine leistungsfähige und robuste Nachweismethode für das Kokzidiostatikum Maduramicin. Aufgrund der Erkenntnisse über die Auswirkungen von Matrixeffekten auf die Multimethode wurden weitere Optimierungsschritte unternommen. Es sollte untersucht werden, ob die spezifischeren Bedingungen einer Einzelanalyt-Methode eine bessere Basis zur Quantifizierung in verschiedenen Matrices darstellen.

## 5 Ergebnisse und Diskussion – Maduramicin-Carry-over

### 5.1 Validierung der Methoden zur Bestimmung von Maduramicin in Futtermittel, Eiweiß und Eigelb

Eine erfolgreiche Validierung der Methoden zur Bestimmung von Maduramicin in Futtermittel, Eiweiß und Eigelb war Grundvoraussetzung für Durchführung des Transferversuches.

#### 5.1.1 Ermittlung des linearen Arbeitsbereiches

Matrixkalibrierreihen im erwarteten Konzentrationsbereich für die drei zu untersuchenden Matrices wurden auf Linearität geprüft. Die dazu berechneten Reststandardabweichungen der Kalibrierfunktionen 1. und 2. Ordnung sind in der Tabelle 15 aufgeführt.

**Tabelle 15:** Reststandardabweichungen der Kalibrierfunktionen 1. und 2. Ordnung von Maduramicin in Eiweiß, Eigelb und Futtermittel (lineare und quadratische Kalibrierfunktion)

Kalibrierbereich	Eiweiß	Eigelb		Futtermittel
	0-5 µg/kg	0-5 µg/kg	0-3,5 µg/kg	0-100 µg/kg
$s_y$ Lineare Funktion (µg/kg)	0,0453	0,0529	0,0431	0,0629
$s_y$ Quadratische Funktion (µg/kg)	0,0469	0,0304	0,0328	0,0561

Anhand des Vergleichs der Reststandardabweichungen ist lediglich der für Eiweiß getestete Kalibrierbereich linear. In Futtermittel ist die Reststandardabweichung der linearen Kalibrierfunktion geringfügig größer als die der quadratischen Kalibrierfunktion, sodass keine eindeutige Aussage über die Linearität getroffen werden kann. Für die Kalibrierfunktion in Eigelb ist von 0– 5 µg/kg ist die quadratische Anpassung besser geeignet als die lineare Anpassung. Reduziert man den Kalibrierbereich auf 0–3,5 µg/kg, so beide Anpassungen gleich gut geeignet. Der Anpassungstest nach Mandel sollte zu einer eindeutigen Aussage führen. Die dazu berechneten Prüfgrößen und Tabellenwerte sind in Tabelle 16 aufgelistet.

**Tabelle 16:** Linearität des Arbeitsbereiches der Maduramicin-Methode (Mandel-Anpassungstest)

Kalibrierbereich	Eiweiß	Eigelb		Futtermittel
	0-5 µg/kg	0-5 µg/kg	0-3,5 µg/kg	0-100 µg/kg
Prüfgröße PG	0,129	23,38	7,52	3,33
Tabellenwert F	9,33	10,04	11,26	11,26

Der Mandel-Anpassungstest zeigt, dass die Matrixkalibrierungen für Eiweiß und für Futtermittel im untersuchten Konzentrationsbereich linear sind. Bei der Matrix Eigelb ist

die Kalibrierung im Bereich von 0-5 µg/kg nicht linear. In dem reduzierten Kalibrierbereich bis 3,5 µg/kg ist die lineare Anpassung besser geeignet. Für die Quantifizierung höherer Maduramicin-Gehalte in Eiweiß oder Eigelb innerhalb des Fütterungsversuches sollten die erforderlichen Kalibrierbereiche nochmals auf Linearität geprüft werden.

### 5.1.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die unter Verwendung der Kalibriergeradenmethode der DIN 32645 ermittelten Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie die Kenndaten der verwendeten Matrixkalibriergeraden sind in Tabelle 17 zusammengestellt. Die Bestimmungsgrenzen in den Ei-Matrices

**Tabelle 17:** Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und Kenndaten der Matrixkalibrierfunktionen von Maduramicin in Eiweiß, Eigelb und Futtermittel

Kenndaten	Eiweiß	Eigelb	Futtermittel
	0-3,75 µg/kg	0-3,75 µg/kg	0-15 µg/kg
Steigung	0,244	0,485	0,051
y-Achsenabschnitt	-0,013	-0,016	0,0003
Bestimmtheitsmaß $R^2$	0,9966	0,9967	0,9896
Nachweisgrenze (µg/kg)	0,33	0,29	2,02
Bestimmungsgrenze (µg/kg)	0,97	0,88	5,78

erlauben die Quantifizierung von Maduramicin unter dem festgelegten Höchstgehalt. Im Futtermittel liegt die Bestimmungsgrenze deutlich unter den im Rahmen des Fütterungsversuches zu analysierenden Gehalten.

### 5.1.3 Wiederfindung und Präzision

Zur Bestimmung der Wiederfindung der Methode wurden die Blankmatrices mit drei verschiedenen Konzentrationen dotiert und im Fünffach-Ansatz analysiert. Die Mittelwerte der in Eiweiß, Eigelb und Futtermittel bestimmten Gehalte und die Wiederfindungsraten der Methode in Tabelle 18 zusammengestellt. Die Wiederfindungsraten in Eiweiß liegen zwischen 100 % und 110 % und in Eigelb zwischen 92 % und 100 %.

**Tabelle 18:** Wiederfindung von Maduramicin in Eiweiß und Eigelb

Dotierung (µg/kg)	Eiweiß		Eigelb		Dotierung (µg/kg)	Futtermittel	
	MW (µg/kg)	WFR (%)	MW (µg/kg)	WFR (%)		MW (µg/kg)	WFR (%)
0,5	0,50	100,0	0,5	100,0	25	25,7	102,9
1,0	1,10	110,0	0,92	92,0	50	50,3	100,6
2,0	2,15	107,5	1,98	99,0	75	76,4	101,9

In der Entscheidung 2002/657 EC sind Kriterien für die Wiederfindungsraten einer Methode im Zusammenhang mit dem Parameter Richtigkeit (Abschnitt 2.3.2.1 2002/657/EG) vorgegeben. In Abhängigkeit von der Analytkonzentration sind Wiederfindungsraten von 50 % - 120 % ( $< 1 \mu\text{g/kg}$ ), 70 % - 110 % ( $> 1 \mu\text{g/kg}$  bis  $10 \mu\text{g/kg}$ ) bzw. 80 % - 110 % ( $> 10 \mu\text{g/kg}$ ) akzeptabel. Diese Kriterien werden von der Methode erfüllt.

Die Wiederfindungsraten in Futtermittel liegen zwischen 100,6 % und 102,9 %. Diese Werte entsprechen auch den Anforderungen der DIN EN 15781:2009 [157] zur Bestimmung von Maduramicin-Ammonium in Futtermittel, nach welcher eine akzeptable Wiederfindungsrate zwischen 90 % und 110 % liegen sollte.

Um die Präzision der Methode unter Wiederhol- und Zwischenbedingungen zu überprüfen, wurden Blankmatrices von Eiweiß, Eigelb und Futtermittel mit drei verschiedenen Maduramicin-Gehalten an zwei Tagen jeweils im 5fach-Ansatz dotiert und analysiert.

**Tabelle 19:** Präzision der Maduramicin-Methode in Eigelb unter Wiederhol- und Zwischenbedingungen

dotierte Maduramicin- Konzentration	Tag	Mittelwert (µg/kg)	Standard- abweichung (µg/kg)	Intraday- Variations- koeffizient (%)	Interday Variations- koeffizient (%)
Eiweiß					
0,5 µg/kg	1	0,56	0,04	7,3	9,1
	2	0,50	0,03	5,7	
1,0 µg/kg	1	1,19	0,07	5,5	7,6
	2	1,10	0,08	7,5	
2,0 µg/kg	1	2,18	0,12	5,5	6,6
	2	2,15	0,18	8,25	
Eigelb					
0,5 µg/kg	1	0,55	0,03	5,3	10,4
	2	0,50	0,06	13,0	
1,0 µg/kg	1	0,92	0,13	14,3	15,2
	2	0,87	0,11	12,2	
2,0 µg/kg	1	1,96	0,23	11,7	9,4
	2	1,98	0,16	7,9	
Futtermittel					
25 µg/kg	1	27,12	2,13	7,9	7,6
	2	25,72	1,84	7,2	
50 µg/kg	1	50,31	4,67	9,3	13,8
	2	51,51	4,05	7,9	
100 µg/kg	1	76,42	6,63	8,7	8,9
	2	82,36	6,81	8,3	

Die ermittelten Intraday- und Interday-Variationskoeffizienten sind in Tabelle 19 zusammengestellt. Die Intraday- und Interday-Variationskoeffizienten in dotierten Eiweiß- und Eigelb-Proben betragen 5,3 % bis 14,3 % (intraday) bzw. 6,6 % bis 15,2 % (interday). Für die Beurteilung dieser Daten werden die Anforderungen der Entscheidung 2002/657/EG herangezogen. Wie in Kapitel 4.6.3 beschrieben, liefert die Horwitz-Gleichung (Formel (17)) für Konzentrationen unter 100 g/kg jedoch inakzeptabel hohe Werte. Die Konzentration geht als Massenanteil ein und wird logarithmiert. Dadurch ergibt sich eine Zahl  $> 4,5$  im Exponenten der Potenz mit der Basis 2 und daraus folgend Variationskoeffizienten  $> 22,6$  %. Deshalb sind für Konzentrationen unter 100 µg/kg keine maximal akzeptierten Variationskoeffizienten festgelegt. Die Variationskoeffizienten sind so gering wie möglich zu halten.

Die Präzision unter Wiederhol- und Zwischenbedingungen in Eiweiß und Eigelb genügt den Anforderungen aus Abschnitt 2.3.2.2. der Entscheidung 2002/657/EG. Die ermittelten Variationskoeffizienten liegen im Bereich der für die laborinterne Präzision bei Analytkonzentrationen bis 100 µg/kg geforderten Variationskoeffizienten von 11,5 % bis 15,3 %.

Bei der Analyse dotierter Futtermittelprobe wurden Intraday-Varianzkoeffizienten von 7,2 % bis 9,3 % und Interday-Variationskoeffizienten von 7,6 % bis 13,8 % ermittelt. Damit genügt die Präzision innerhalb eines Tages und zwischen zwei Tagen den Anforderungen der Entscheidung 2002/657/EG (Abschnitt 2.3.2.2.), die jedoch für Lebensmittel tierischen Ursprungs gilt. Bisher wurden keine Leistungskriterien für die Analysenmethoden für Kokzidiostatika in Futtermittel für Nicht-Zieltierarten festgelegt. Als Anhaltspunkt zur Beurteilung der Präzisionsdaten soll eine standardisierte Maduramicin-Nachweismethode dienen. In der DIN EN 15781:2009 [157] zur Bestimmung von Maduramicin-Ammonium in Futtermittel mit HPLC und Nachsäulenderivatisierung im Konzentrationsbereich der Höchstgehalte in Futtermittel für Zieltierarten sind Präzisionsdaten aus einer Validierungsstudie angegeben. Bei dem niedrigsten Maduramicin-Gehalt von 2,5 mg/kg wurde ein Variationskoeffizient der Wiederholpräzision von 8,23 % ermittelt. Diese Größe entspricht in etwa dem Interday-Variationskoeffizienten, welcher in der vorliegenden Arbeit in der gleichen Größenordnung liegt.

Im Hinblick auf die Wiederholbarkeit der Methode wurden die Ergebnisse der Versuchstage zusätzlich mittels Varianzanalyse (F-Test) auf signifikante Unterschiede untersucht. Die einfaktorielle Varianzanalyse wurde unter Annahme von 5 % Irrtumswahrscheinlichkeit durchgeführt. In den drei Matrices wurde bei keiner Dotierung ein signifikanter Unterschied zwischen den Ergebnissen der Analysentage ermittelt.

Die Präzision der Methode ist abhängig von der Art der Matrix und der Konzentration des Analyten. Die höchste Präzision wird bei der Analyse in Eiweiß erzielt. In Futtermittel wurden ähnliche Variationskoeffizienten erreicht, da aufgrund des höheren Konzentrationsbereiches eine Reduktion der Matrixstärke der Proben möglich war. In der stark fetthaltigen Matrix Eigelb wurden Variationskoeffizienten von durchschnittlich  $> 10$  % ermittelt.

### Robustheit

Die Robustheit der Methode wurde im Hinblick auf den Einfluss des Bearbeiters auf das Analysenergebnis untersucht. Drei verschieden dotierte Eiweiß-, Eigelb- und Futtermittel-Blankmaterialien wurden von zwei Bearbeitern jeweils im Fünffach-Ansatz analysiert. Es wurde mittels F-Test geprüft, ob sich die Ergebnisse von verschiedenen Bearbeitern signifikant unterscheiden. Aus den Versuchsbedingungen ergab sich der Tabellenwert 5,318 für den kritischen F-Wert bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Die Prüfgröße F war bei der niedrigen Dotierung 0,5 µg/kg in Eiweiß und Eigelb größer als der kritische F-Wert (Tabelle 20).

**Tabelle 20:** Einfluss des Bearbeiters auf die Robustheit der Maduramicin-Methode

dotierte Maduramicin- Konzentration	Tag	Mittelwert (µg/kg)	Standard- abweichung (µg/kg)	Variations- koeffizient (%)	Prüfgröße F
Eiweiß					
0,5 µg/kg	1	0,56	0,04	7,32	-*
	2	0,47	0,04	8,82	
1,0 µg/kg	1	1,19	0,07	5,45	0,18
	2	1,22	0,13	10,71	
2,0 µg/kg	1	2,18	0,12	5,45	0,08
	2	2,13	0,32	14,90	
Eigelb					
0,5 µg/kg	1	0,55	0,03	5,31	-*
	2	0,38	0,03	9,00	
1,0 µg/kg	1	0,92	0,17	18,30	2,01
	2	1,03	0,04	4,30	
2,0 µg/kg	1	1,96	0,23	11,73	4,81
	2	1,72	0,09	5,11	
Futtermittel					
25 µg/kg	1	27,12	2,13	7,85	0,13
	2	26,53	2,95	11,11	
50 µg/kg	1	50,31	9,71	19,30	0,12
	2	51,82	2,03	3,91	
100 µg/kg	1	76,42	6,63	8,68	0,91
	2	72,38	6,76	9,34	

\* Wert nicht angegeben, da Konzentration unterhalb der Bestimmungsgrenze

Ursache dafür ist, dass diese Konzentration unterhalb der Bestimmungsgrenze der Methode liegt (Tabelle 17). Bei dieser Konzentration lag deshalb ein signifikanter Unter-

schied zwischen den Analyseergebnissen von Bearbeiter 1 und 2 vor. Bei allen anderen Konzentrationsstufen und in der Matrix Futtermittel ist die Methode robust gegenüber einem Bearbeiterwechsel.

### **Fazit Einzelmethode**

Die Ergebnisse der Validierung zeigen, dass die Maduramicin-Einzelmethode die erforderliche Leistungsfähigkeit aufweist, um die im Rahmen des Fütterungsversuches anfallenden Proben zu analysieren. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie die Präzision entsprechen den gestellten Anforderungen und gewährleisten so eine zuverlässige Quantifizierung des Kokzidiostatikums in allen Matrices. Um diese Bedingungen über den gesamten Versuchsverlauf zu garantieren, sind Qualitätssicherungsmaßnahmen durchzuführen. Das Mitführen einer Probe mit bekanntem Gehalt kann sowohl Rückschlüsse auf eventuelle Verluste bei der Probenaufarbeitung als auch den Zustand des Messgerätes innerhalb der Probenserie geben.

## 5.2 Carry-over von Maduramicin aus dem Futtermittel in das Ei

### 5.2.1 Aufbau und Ablauf des Fütterungsversuches

Der Fütterungsversuch wurde in drei Gruppen mit unterschiedlichen Maduramicin-Konzentrationen durchgeführt. An jeweils 10 Lohmann-Braun-Hennen wurde eine der drei Konzentrationsstufen verabreicht. Die Hühnergruppen wurden in geschlossenen Räumen von etwa 20 m<sup>2</sup> gehalten, welche eine Fensterfläche von mindestens 10 % der Grundfläche aufwiesen. Die Ställe waren im Wandbereich gefliest, die Betonböden waren mit Sand ausgestreut. Den Tieren standen Sitzstangen und Legeboxen zur Verfügung. Es stand jederzeit ausreichend Tränkwasser zur Verfügung.



**Abbildung 58:** Henne in Legebox, Vorrichtung zur Entnahme der Eier

Die Hennen wurden vor Beginn der Fütterungsphase über mehrere Wochen an das Basisfutter TÜK TÜK Type 072 gewöhnt, in welches später der Wirkstoff eingemischt wurde. Während des gesamten Versuches wurde den Legehennen einmal täglich zur selben Zeit eine neue Futterration zugeteilt. Das Futter stand den Tieren zur freien Verfügung. Zur gleichen Zeit wurden einmal täglich die Eier gesammelt. Jeder Versuch beinhaltete eine dreitägige Vorphase während der Verabreichung von Maduramicin-freiem Futter, in welcher täglich je vier Eier gesammelt wurden. Darauf folgten eine Haupt- und eine Nachphase. Die Hauptphase, in der Maduramicin-haltiges Futter in den drei verschiedenen Konzentrationen gefüttert wurde, dauerte jeweils 21 Tage. In der folgenden Nachphase bekamen die Hennen wieder wirkstofffreies Futter. Die Eier wurden noch zwei bis vier Wochen lang gesammelt. Der in dieser Form geplante Fütterungsversuch wurde beim Landesamt Berlin für Gesundheit und Soziales beantragt und von der Behörde genehmigt.

Die gesammelten Eier wurden kühl gelagert und innerhalb von vier Tagen getrennt. Eiweiß und Eigelb wurden in Glasgefäße mit Schraubdeckel gefüllt, mittels Ultra-Turax homogenisiert und bei 4 °C bis zur Analyse aufbewahrt. Der Transport zwischen Ver-



suchsstall und Labor erfolgte in Styropor-Isolierboxen, welche zur Kühlung der Eiprobe mit Kühlakkus versehen waren. Die Herstellung und Untersuchung des Futtermittels waren Bestandteil des Versuches.

### 5.2.2 Herstellung des Futtermittels mit definiertem Maduramicin-Gehalt

Maduramicin ist als Premix Cygro® mit 1 % Wirkstoff erhältlich. Unter Berücksichtigung der zur Verfügung stehenden Ausrüstung und der heterogenen Zusammensetzung (Tabelle 21) des Mischfuttermittels war es erforderlich, zunächst eine Vormischung mit etwa 5 mg/kg Maduramicin aus dem Wirkstoff-Premix herzustellen.

**Tabelle 21:** Zusammensetzung des Basisfutters TÜK-TÜK (Legehennenfutter Type 072)

Zusammensetzung	Zusatzstoffe	Inhaltsstoffe	Anteil in %
Mais	Vitamin A	Rohprotein	16,4
Weizen	Vitamin D3	Rohfett	4,3
Sojaextraktionsschrot	Kupfer (als Cu-(II)-Salz)	Rohfaser	3,3
Calciumcarbonat	Vitamin E	Rohasche	12,3
Melasse	DL- $\alpha$ -Tocopherol	Calcium	3,5
Maisklebefutter	Cantaxanthin	Natrium	0,2
Weizengriesskleie	Lutein	Phosphor	0,3
Sojaöl		Methionin	0,36
Ca-Natrium-Phospat			
Methionin			
Natriumchlorid			

Das Legehennenfutter, in welches der Wirkstoff eingemischt werden sollte, wurde zuvor auf eine mögliche Maduramicin-Kontamination getestet. Dazu wurde eine Standardaddition von 0  $\mu$ g/kg bis 40  $\mu$ g/kg mit dem Basisfutter durchgeführt. Anhand der Regressionsgeraden der Standardaddition konnte eine Kontamination des Futters mit Maduramicin ausgeschlossen werden.

### Herstellung und Homogenität der Vormischung

Die Nachweismethode wurde an die erwartete Konzentration des Kokzidiostatikums in der Vormischung durch eine Verdünnung um Faktor 100 angepasst. Zur Quantifizierung diente eine Matrixkalibrierung im Bereich von 0 – 7,2 mg/kg. Jede der 10 Proben wurde zweifach aufgearbeitet und analysiert. In Tabelle 22 sind die Ergebnisse der Homogenitätsprüfung der Vormischung für die Auswertung des ersten MRM-Übergangs mit (interne Kalibrierung) und ohne (externe Kalibrierung) Korrektur über den internen Standard zusammengestellt.

Die Homogenitätsprüfung der Vormischung ergab unterschiedliche Resultate in Abhängigkeit von der Art der Berechnung des Maduramicin-Gehaltes. Bei Berechnung über externe Kalibrierung war die Vormischung homogen, unter Verwendung des internen

**Tabelle 22:** Homogenitätsprüfung der Maduramicin-Vormischung

Kenndaten	Maduramicin (extern)	Maduramicin (intern)
Mittelwert (mg/kg)	5,29	5,02
Variationskoeffizient (%)	7,62	7,91
Prüfgröße F	2,42	3,83
kritischer F-Wert (n1=10, n2=2, pi=0,05)		3,02

Standards Nigericin inhomogen. Trotzdem wurde die Verteilung des Wirkstoffs in der Vormischung als ausreichend erachtet, um die niedriger konzentrierten Futtermittelmischungen daraus herzustellen. Auf einen erneuten Mischvorgang wurde deshalb verzichtet.

### **Herstellung und Homogenität der 10 µg/kg-, 30 µg/kg- und 50 µg/kg-Maduramicin-Futtermittel**

Aus der Vormischung und dem Maduramicin-freien Legehennenfutter wurden die Futtermittel mit drei Maduramicin-Konzentration nach dem Cross Riffing Verfahren (siehe Abschnitt 3.9.2) hergestellt. Aufgrund der technischen Ausstattung mussten je Konzentration zwei Chargen à 25 kg Futtermittel hergestellt werden. Jede der beiden Chargen der Maduramicin-Futtermittelmischungen wurde anhand von 10 zufällig gezogenen Proben auf Homogenität getestet.

**Tabelle 23:** Analyse der Homogenitätsproben der 3 Futtermittelmischungen

Maduramicin-Konzentration	Kalibrierbereich	Mittelwert (µg/kg)	Standard- abweichung (µg/kg)	Variations- koeffizient (%)	Prüf- größe F
10 µg/kg Charge 1	0-25 µg/kg	13,6	2,4	17,6	2,14
10 µg/kg Charge 2		8,4	1,3	15,5	2,61
30 µg/kg Charge 1	0-60 µg/kg	26,2	4,2	16,0	2,64
30 µg/kg Charge 2		28,0	5,0	17,9	7,54
50 µg/kg Charge 1	0-90 µg/kg	46,3	5,7	12,3	2,45
50 µg/kg Charge 2		48,2	6,6	13,7	1,36
Kritischer F-Wert					3,02

Mit Hilfe eines Probenstechers wurden je ca. 60 g Futtermittel pro Probe entnommen. Durch die Verwendung dieses Allschicht-Sammlers enthielt jede Probe Futtermittel aus dem unteren, mittleren und oberen Bereich eines Fasses. Wie bei der Untersuchung der Vormischung wurden alle Proben gemahlen, über Kopf geschüttelt und im Zweifach-Ansatz analysiert. Für jede der erwarteten Maduramicin-Konzentrationen wurde eine

Matrixkalibrierreihe zur Quantifizierung angepasst. Tabelle 23 zeigt die Kalibrierbereiche und die Ergebnisse der Homogenitätsprüfung. Die Abweichungen vom Mittelwert für jede Charge lagen deutlich über den bei der Validierung ermittelten Schwankungen der Methode (Intraday-Variationskoeffizienten). Die Varianzanalyse zeigte, dass bis auf Charge 2 der 30 µg/kg-Dosierung alle Mischungen homogen waren. Aufgrund des hohen Homogenisierungsaufwandes wurde auf einen erneuten Mischvorgang verzichtet. Für den 30 µg/kg-Teilversuch wurde deshalb zunächst die homogene Charge 1 verwendet und Charge 2 zur Fütterung während der letzten zwei Tage der Hauptphase verwendet.

### 5.2.3 Analyse der Futtermittel-Kontrollproben und der anfallenden Futtermittelreste

Während der Hauptphasen des Fütterungsversuches wurden die Tagesgesamtrationen für die jeweilige Gruppe von Hühnern in 3,6-Liter-Kunststoffäusser abgefüllt. Diese wurden vor der Fütterung für eine Stunde über Kopf geschüttelt um eine mögliche Entmischung durch längeres Stehen zu vermeiden. Eine Probe von ca. 50 g (Kontrollprobe) wurde entnommen und anschließend die Futterration in den Futterspender gefüllt. Zuvor wurde jeweils das Restfutter vom Vortag aus dem Spender entfernt, abgefüllt und gewogen. Sowohl die Kontrollprobe als auch das Restfutter wurden komplett gemahlen, erneut gemischt und analysiert.

#### Erster Teilversuch – 10 µg/kg-Futtermittel

Die in den Kontrollproben (vor der Fütterung) und im Restfutter ermittelten Maduramicin-Gehalte sind in Abbildung 59 aufgetragen. Zusätzlich wurden die theoretischen Konzentrationen im verabreichten Futter aus den Gehalten der analysierten Proben berechnet und im Diagramm dargestellt.

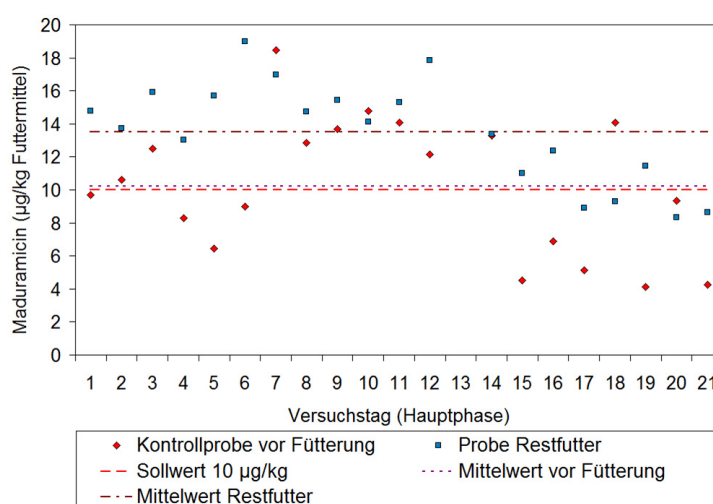


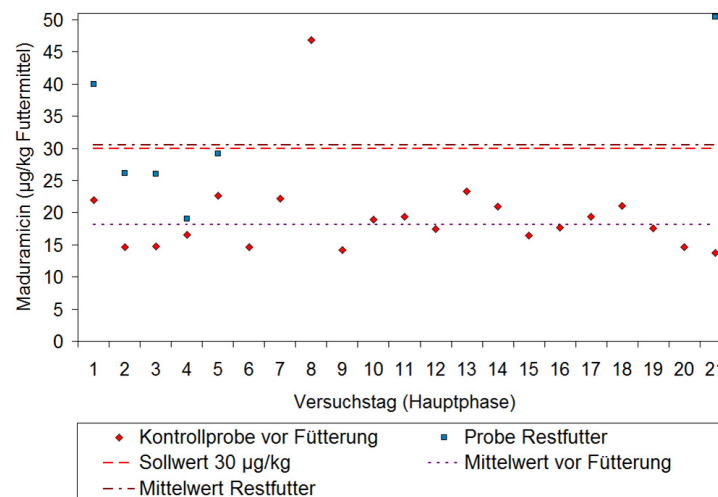
Abbildung 59: Maduramicin-Gehalte in Kontrollproben und Restfutter (1. Teilversuch)

Es wird deutlich, dass im Restfutter eine höhere Maduramicin-Konzentration vorlag als in der Tagesration zum Zeitpunkt der Futtervorlage. Die Gehalte schwankten außerdem stark zwischen den Versuchstagen. Die höhere Konzentration im Restfutter kann durch die heterogene Zusammensetzung des Basisfutters erklärt werden. Die Hennen bevorzugen Getreidekörner und Schrotbestandteile gegenüber den feinen Stäuben, welche auch den Wirkstoff enthalten. Auf diese Weise setzt sich ein Teil des Maduramicins am Boden des Futterbehälters ab und wird als Restfutter entfernt.

Der Mittelwert der täglich vor der Fütterung entnommenen Kontrollproben entsprach mit 10,2 µg/kg dem für den Versuch vorgesehenen Sollwert von 10 µg/kg. Im Restfutter betrug die Maduramicin-Konzentration durchschnittlich 13,5 µg/kg. Die Variationskoeffizienten betrugen 37 % bei den Proben vor der Fütterung und 22 % bei den Restfutterproben. Diese Abweichungen lassen vermuten, dass die Lagerung zur Entmischung des Futtermittels führt, die durch Schütteln nicht zu verhindern ist. Beim ersten Teilversuch stimmte der ermittelte Maduramicin-Gehalt in den Kontrollproben mit der Sollkonzentration von 10 µg/kg überein. Da die Konzentration in Charge 1 laut Homogenitätstest mit 13 µg/kg höher war als geplant, lag die Konzentration in den Kontrollproben durch die Entmischung dann im gewünschten Bereich.

### Zweiter Teilversuch – 30 µg/kg-Futtermittel

Im zweiten Teilversuch war nur an sieben Tagen Restfutter vorhanden. An allen anderen Tagen wurde das Futter vollständig verbraucht. Verluste von Futtermittel, das während des Fressens verschüttet wurde, konnten nicht kontrolliert und dadurch nicht berücksichtigt werden. Die Gehalte im Restfutter sowie in den Kontrollroben, die vor der Fütterung entnommen wurden, sind in Abbildung 60 dargestellt.



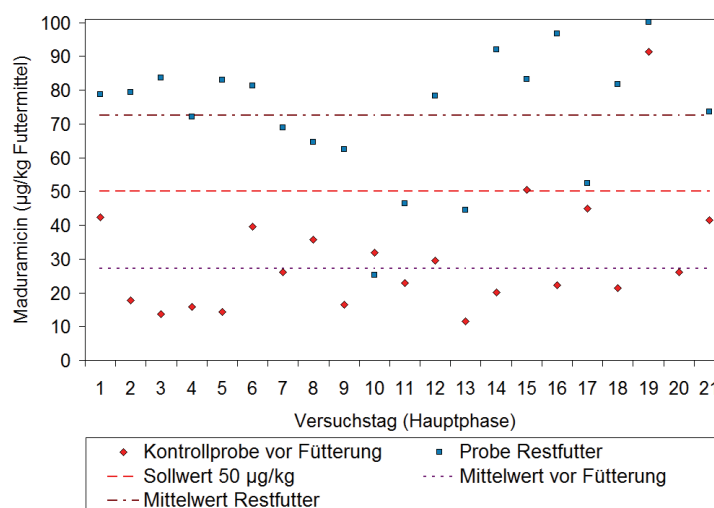
**Abbildung 60:** Maduramicin-Gehalte in Kontrollproben und Restfutter (2. Teilversuch)

Der Mittelwert in den Proben vor der Fütterung war mit 18 µg/kg sehr niedrig in Bezug auf die Zielkonzentration von 30 µg/kg. Im Restfutter entsprach der Mittelwert in

etwa dem Wert von 30 µg/kg. Unter den gegebenen Bedingungen waren die berechneten Maduramicin-Mengen im tatsächlich verbrauchten Futter nahezu identisch mit denen in den Proben vor der Fütterung. Auswirkungen dieser niedrigen Konzentration auf die ermittelte Carry-over-Rate aus dem Futtermittel in das Ei werden unter dem Punkt 5.2.7 erörtert. Die Schwankung zwischen den Maduramicin-Gehalten in den Kontrollproben (vor der Fütterung) war mit einem Variationskoeffizienten von 16 % relativ gering. Im Restfutter betrug dieser ca. 35 % und ist damit vergleichbar mit dem im ersten Teilversuch.

### Dritter Teilversuch – 50 µg/kg-Futtermittel

Noch deutlicher als beim zweiten Teilversuch ist der zu niedrige durchschnittliche Maduramicin-Gehalt in den vor der Fütterung entnommenen Futtermittelproben (Abbildung 61).



**Abbildung 61:** Maduramicin-Gehalte in Kontrollproben und Restfutter (3. Teilversuch)

Im dritten Teilversuch betrug dieser mit etwa 27 µg/kg nur 54 % der Zielkonzentration von 50 µg/kg. Bei Betrachtung der Einzelwerte der Versuchstage wird eine große Streuung deutlich. Konzentrationen zwischen 10 µg/kg und 52 µg/kg wurden ermittelt. Im Restfutter lag, wie im ersten und zweiten Teilversuch, eine höhere Maduramicin-Konzentration vor. Im Durchschnitt lag diese bei ca. 72 µg/kg. Messfehler konnten durch die als Qualitätskontrollproben parallel analysierten Proben aus der Homogenitätsstudie des 50 µg/kg-Futtermittels ausgeschlossen werden. Die ermittelte Konzentration in der Qualitätskontrollprobe lag im erwarteten Bereich um 48 µg/kg. Im dritten Teilversuch war die Schwankung der Maduramicin-Konzentration in den Proben vor der Fütterung sehr hoch, der Variationskoeffizient betrug fast 60 %. Dagegen entsprach die Abweichung zwischen den Restfutterproben in etwa denen aus den anderen Teilversuchen mit einem Variationskoeffizienten von 34 %. Ursache für den großen Unterschied zwischen

den Maduramicin-Gehalten in der Probe vor der Fütterung und dem Restfutter könnte u.a. die Art der Probenahme vor der Fütterung sein. Möglicherweise hat sich ein Teil des Wirkstoffs während der Lagerung am Boden des Behälters abgesetzt und die Dauer des Über-Kopf-Schüttelns vor der Fütterung war nicht ausreichend, um den Wirkstoff wieder homogen zu verteilen. Möglicherweise haben sich kleine Maduramicin-enthaltende Partikel aufgrund elektrostatischer Aufladung an der Behälterinnenwand angesammelt und wurde nicht vollständig beim Schütteln abgelöst.

### Qualitätskontrolle bei der Analyse der Futtermittel-Proben

Um die Qualität der Futtermittelanalysen sicherzustellen, wurde in jeder Messserie eine im mittleren Bereich der Kalibrierreihe dotierte Blank-Futtermittelprobe mitgeführt. Anhand dieser Positivkontrollprobe wurde die Wiederfindungsrate überprüft und in einem Shewart-Control-Chart dokumentiert. Neben der Kontrolle der Einhaltung der in der Testphase ermittelten Grenzen (siehe Tabelle 24) konnten so auch Außerkontrollsituationen erkannt werden.

**Tabelle 24:** Grenzen der zweiseitigen Qualitätskontrollkarte (Shewart Control Chart) über die Wiederfindungsraten bei der Analyse der Futtermittelproben

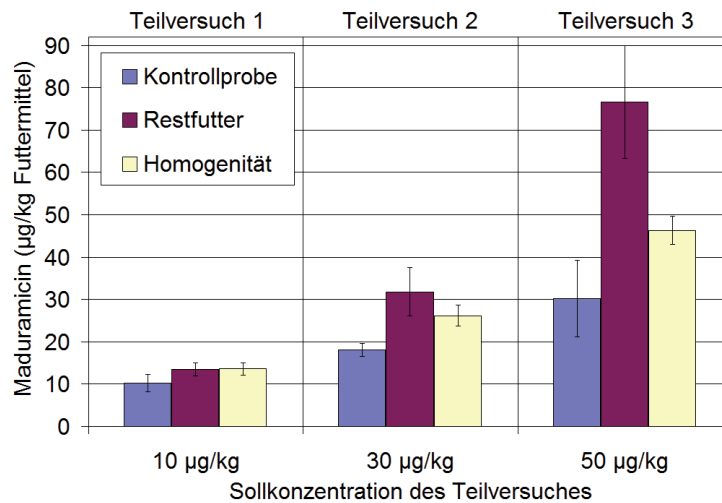
Parameter	Wiederfindungsrate in %
Mittelwert	101,9
untere Warngrenze	94,2
obere Warngrenze	109,7
untere Toleranzgrenze	90,3
obere Toleranzgrenze	113,6

Die Warngrenzen stimmen mit den in Kapitel 5.1.3 beschriebenen Forderungen der DIN EN 15781:2009 [157] zur Bestimmung von Maduramicin-Ammonium in Futtermittel bezüglich der Wiederfindungsraten überein. In keiner der Messserien zur Überprüfung der Homogenität und zur Kontrolle der Maduramicin-Konzentration während des Fütterungsversuches wurden die Warngrenzen erreicht bzw. überschritten.

### Fazit Homogenität und Konzentration von Maduramicin im Futtermittel

Für die Homogenisierung der Futtermittelmischungen mit den gewünschten Maduramicin-Konzentrationen wurde das Cross Riffing Verfahren nach Van der Veen [147] eingesetzt. Die Futtermittelaliquote wurden im Rhönradmischer gemischt. Die Maduramicin-Konzentrationen in den so hergestellten Futtermittelmischungen entsprachen nicht genau den Zielkonzentrationen von 10 µg/kg, 30 µg/kg und 50 µg/kg, wie Abbildung 62 zeigt.

Bis auf die Charge 1 des 10 µg/kg-Futtermittels waren alle Chargen etwas niedriger konzentriert als vorgesehen. Für die Durchführung des Fütterungsversuches war dies ausreichend. Da die Tiere in Bodenhaltung gehalten wurden, kann die pro Henne aufgenommene absolute Maduramicin-Menge nicht berechnet werden. Die Homogenität der



**Abbildung 62:** Mittlere Maduramicin-Konzentrationen in den vor der Fütterung aus den Tagesrationen entnommenen Kontrollproben, im Restfutter und in den nach Homogenisierung entnommenen Futtermittelpuben. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Futtermittel wurde bei fünf von sechs Chargen mittels einfaktorieller Varianzanalyse bestätigt. Charge 2 des 30 µg/kg-Futters war inhomogen. Es war unklar, ob ein weiterer Mischdurchlauf zur Homogenität geführt hätte. Da mit der ersten Charge 18 von 21 Fütterungstagen abgedeckt werden konnten, wurde die Inhomogenität für die verbleibenden drei Tage akzeptiert. Die Homogenisierung der Futtermittel war aufgrund von verschiedenen Faktoren problematisch. Aufgrund der heterogenen Zusammensetzung des Legehennenfutters TÜK TÜK, in welches der Maduramicin-Premix eingemischt wurde, ist ein Absetzen des pulverförmigen Wirkstoffes im Behälter als Ursache für die abweichenden Maduramicin-Konzentrationen denkbar. Die pulverförmige Wirkstoffformulierung könnte sich auch elektrostatisch aufladen und dadurch beim Mischvorgang an der Innenwand des verwendeten Kunststoffbehälters haften bleiben.

Für die Fütterung wurden direkt nach der Homogenisierung, oder nach erneutem Durchmischen der Charge, Tagesrationen in separate Behälter abgefüllt. Diese wurden vor der Fütterung erneut eine Stunde im Überkopfschüttler gemischt und eine Probe entnommen. Anfallendes Restfutter wurde täglich vor Fütterung der neuen Tagesration entfernt und beide wurden auf den Maduramicin-Gehalt überprüft. Die Konzentration im Restfutter war generell höher als die in der Kontrollprobe der Tagesration (siehe Abbildung 62), was unter anderem durch das Pickverhalten der Tiere zu erklären ist. Wirkstoffpartikel, die nicht an größeren „pickbaren“ Teilen wie Getreidekörnern haften, setzen sich am Boden des Futterbehälters ab, was zur Erhöhung der Konzentration im verbleibenden Futter führt.

Der Mittelwert der Kontrollproben der Tagesrationen entsprach beim ersten Teilversuch in etwa dem Sollwert von 10 µg/kg, bei den anderen beiden Versuchen betrug dieser nur 60 % und 54 % des Sollwertes. Eine mögliche Erklärung ist auch hier die heterogene

Zusammensetzung der Futtermischung, die ein Absetzen des Wirkstoffpulvers begünstigt. Denkbar ist auch, dass durch das erneute Überkopfschütteln der Tagesration vor der Fütterung eine zusätzliche statische Aufladung der Maduramicin-Partikel stattfand, wodurch diese an der Behälterwand hafteten. Für die zweite Vermutung spricht auch der theoretisch berechnete Gehalt des verbrauchten Futtermittels aus der Differenz der Gesamtfuttermischung, der Kontrollprobe und dem Restfutter. Diese Werte entsprechen in etwa dem Gehalt der Kontrollprobe der Tagesration, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die aus dem oberen Behälterbereich entnommene Probe repräsentativ für das gesamte Behältervolumen war. Beim Ausschütten des Futters würde das am Rand haftende Kokzidiostatikum im Behälter zurückbleiben. Da kleine Partikel im Verhältnis zum Volumen eine größere Oberfläche aufweisen als große Partikel, kann an ihnen auch mehr Wirkstoff haften bleiben, woraus sich der erhöhte Gehalt im Restfutter ergibt. Diese Beobachtungen lassen sich auch auf die Futtermittelherstellung im großen Maßstab übertragen, wo sie zur Verschleppung von Wirkstoffen aus einer Futtermittelcharge in deren Folgechargen und dadurch zur Kreuzkontamination von Futtermittel für Nicht-Zieltierarten führen können.

Zwischen den Kontrollproben der Tagesrationen eines Teilversuches traten starke Schwankungen auf, Variationskoeffizienten von 16 % bis zu 60 % wurden ermittelt. Der Grund für diese Schwankungen war nicht die LC-MS/MS-Analyse, da die mitgeführten Qualitätskontrollproben in einem Bereich von 95 % und 108 % Wiederfindungsrate lagen. Die Ursache muss daher bei der Lagerung der Hauptchargen bzw. der Tagesrationen liegen, die zur Entmischung geführt haben könnte. Bei der Abfüllung würde sich die inhomogene Verteilung des Wirkstoffes in der Hauptcharge in den Konzentrationen der Kontrollproben der Tagesportionen widerspiegeln.

Um eine Entmischung zu vermeiden, könnte das Kokzidiostatikum in Pellets gepresst werden. Allerdings wäre beim Einmischen des Wirkstoffes in das gemahlene Futtermittel vor dem Pressen der Pellets ebenfalls eine umfangreiche Prüfung der Homogenität erforderlich. Auch beim Pressen der Pellets kann es zu Inhomogenitäten kommen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass bei der Fütterung von Pellets eine größere Menge an Maduramicin aufgenommen würde als bei dem verwendeten Legehennenfutter. Trotzdem wurde diese Futterform bewusst für den Versuch gewählt um eine praxisnahe Situation nachzustellen, da das Füttern von Körner-haltigem Alleinfutter üblich ist.

### **Berechnung der aufgenommenen Maduramicin-Menge**

Die pro Huhn aufgenommene Menge an Maduramicin ist zur Berechnung der Carry-over-Rate von Maduramicin aus dem Futtermittel in das Ei erforderlich. Die Berechnung der aufgenommenen Maduramicin-Menge erfolgte entsprechend Formel (17) durch Subtraktion der Maduramicin-Menge im Restfutter von der absoluten Maduramicin-Menge in der Tagesration. Dieser Wert für alle Versuchstage aufsummiert, durch die Anzahl der Versuchstage und Versuchstiere dividiert. Für die Berechnung der Maduramicin-Menge in der Tagesration wird die Konzentration an Maduramicin in der Tagesration benötigt. Aufgrund der in Abschnitt 5.2.3 diskutierten Problematik der Entmischung von im Maduramicin im Futtermittel wurden drei verschiedene Annahmen über die Konzentration



in der Tagesration zugrunde gelegt und verglichen.

$$m_{\text{Maduramicin-Aufnahme}} = \frac{\sum_i (c_i \cdot m_{\text{Tagesration}} - c_{i(\text{Restfutter})} \cdot m_{i(\text{Restfutter})})}{n_{\text{Versuchstage}} \cdot n_{\text{Versuchstiere}}} \quad (17)$$

Ansatz 1:  $c_i = c_{i(\text{Kontrollprobe})}$

Ansatz 2:  $c_i = c_{\text{theoretisch}}$

Ansatz 3:  $c_i = c_{\text{Homogenitätstest}}$

Für den ersten Ansatz wurde angenommen, dass die Konzentration in der Kontrollprobe der Konzentration der Gesamttagesration entsprach. Beim Ansatz 2 wird die theoretische Maduramicin-Konzentration (10 µg/kg, 30 µg/kg, 50 µg/kg) eingesetzt und beim Ansatz 3 wird der im Homogenitätstest ermittelte Gehalt als Konzentration in der Tagesration angenommen.

#### 5.2.4 Analyse der Eiweiß-Proben

Zunächst wurden die Eiweiß-Proben der ersten Versuchsgruppe (10 µg/kg) vollständig bis zum 13. Tag der Hauptphase analysiert. In keiner der Eiweiß-Proben wurde Maduramicin nachgewiesen. Daraufhin wurden die Eiweiß-Proben des Versuchsteils mit der höchsten verabreichten Maduramicin-Konzentration analysiert. Von diesem Versuch wurden jeweils eine Stichprobe pro Tag der Hauptphase und alle Eiweiß-Proben des 15. Tages der Hauptphase untersucht. Auch in diesen Proben lag der Maduramicin-Gehalt unter der Nachweisgrenze (siehe Tabelle 17). Deshalb wurden keine weiteren Eiweiß-Proben analysiert. Bei den in diesem Versuch gewählten Konzentrationen ist ein Transfer von Maduramicin in das Eiweiß nicht nachweisbar.

#### 5.2.5 Analyse der Eigelb-Proben

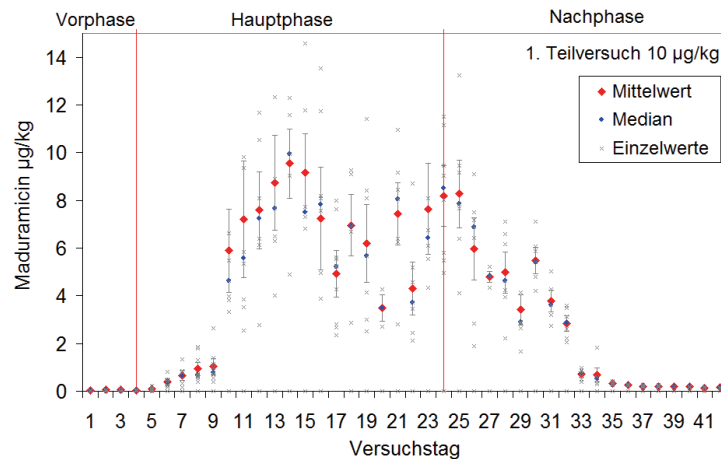
Zur Quantifizierung von Maduramicin wurden die Konzentrationsbereiche der Matrixkalibrierung immer wieder der erwarteten Konzentration angepasst. Jedes Eigelb wurde untersucht und der ermittelte Maduramicin-Gehalt zum entsprechenden Legetag aufgetragen.

#### 5.2.6 Eigelbproben des ersten Teilversuchs mit 10 µg/kg-Futtermittel

Maduramicin war bereits wenige Tage nach Beginn der Fütterung des wirkstoffhaltigen Futters im Eigelb nachweisbar. Der Verlauf der Maduramicin-Konzentration ist in Abbildung 63 aufgetragen. Die Nachweisgrenze der Methode wurde am dritten Tag der Hauptphase überschritten, die Bestimmungsgrenze am fünften Tag. Zunächst stieg die Maduramicin-Konzentration langsam über sechs Tage auf ca. 1 µg/kg, um dann innerhalb von zwei weiteren Tagen auf über 7 µg/kg anzusteigen.

Die Form des Anstiegs ähnelt, typisch für Dosis-Antwort-Beziehungen, einer sigmoidalen Funktion. Ein Maximum von 9,5 µg/kg wurde nach 11 Fütterungstagen erreicht. Auf

dieses folgte ein leichtes Absinken des Maduramicin-Gehaltes unter dieses erste Maximum. Bis zum Ende der Hauptphase waren Schwankungen um 2 µg/kg bis 4 µg/kg zwischen den Versuchstagen zu beobachten. Nach dem Absetzen des Maduramicin-haltigen Futtermittels sank die Maduramicin-Konzentration im Eigelb innerhalb von 9 Tagen unter 1 µg/kg und unter die Nachweisgrenze. Aus den Einzelwerten der Eier eines Tages wurden jeweils der Mittelwert und der Median berechnet und mit den Einzelwerten und den Standardabweichungen nach Versuchstagen aufgetragen.



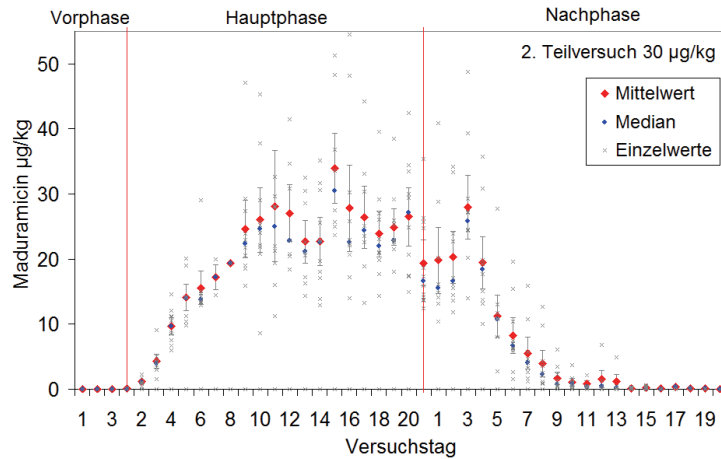
**Abbildung 63:** Verlauf der Maduramicin-Konzentration in Eigelb im 1. Teilversuch (Einzelwerte, Mittelwerte und Mediane für jeden Versuchstag)

Die Mittelwerte und Mediane eines Versuchstages sind meistens ähnlich. Sie unterscheiden sich im ersten Teilversuch um maximal 40 %. Meist ist der Mittelwert etwas höher als der Median.

### Eigelbproben des zweiten Teilversuchs mit 30 µg/kg-Futtermittel

Die Maduramicin-Konzentration im Eigelb nahm beim zweiten Teilversuch ab dem zweiten Tag der Hauptphase annähernd linear zu, wie Abbildung 64 zeigt. Beim ersten Teilversuch erfolgte der Anstieg dagegen fast exponentiell. Am 10. Tag der Hauptphase war ein erstes Maximum des Maduramicin-Gehaltes mit etwa 26 µg/kg erreicht. Bis zum dritten Tag der Nachphase war im Mittel keine Konzentrationsabnahme zu beobachten. Danach ging die Konzentration exponential zurück. Ab dem 14. Tag der Nachphase lag der Mittelwert im Eigelb unter der Nachweisgrenze der Methode.

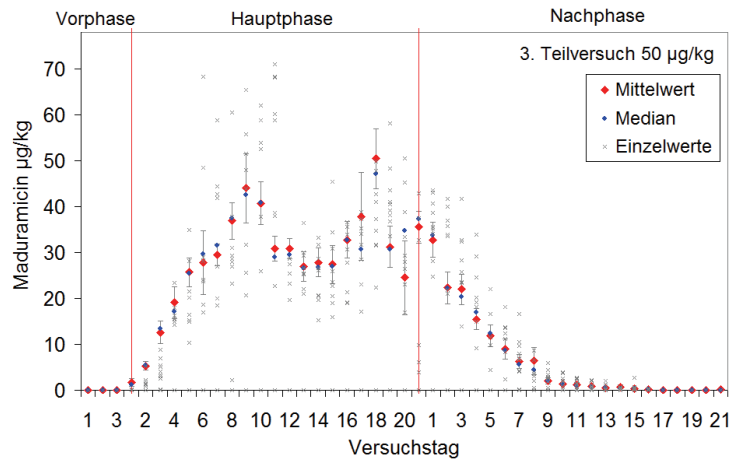
Auch beim Versuch mit 30 µg Maduramicin pro Kilogramm Futtermittel waren Mittelwert und Medianwert eines Versuchstages ähnlich. In dem plateau-ähnlichen Zeitraum vom 10. Tag der Hauptphase bis zum 3. Tag der Nachphase waren die Mittelwerte meist etwas höher als die Mediane.



**Abbildung 64:** Verlauf der Maduramicin-Konzentration in Eigelb im 2. Teilversuch (Einzelwerte, Mittelwerte und Mediane für jeden Versuchstag)

### Eigelbproben des dritten Teilversuchs mit 50 µg/kg-Futtermittel

Bei der Fütterung des Maduramicin-Höchstgehaltes für Verschleppung in Futtermittel für Nicht-Zieltierarten (Abbildung 65) stieg die Konzentration im Eigelb bis zum 11. Tag der Hauptphase auf durchschnittlich 43 µg/kg. Daraufhin folgte ein leichter Rückgang der Maduramicin-Gehalte bis zum 18. Hauptphasentag. Vor dem Absetzen des belasteten Futters stieg die Konzentration im Eigelb noch einmal an. Etwa am 10. Tag der Nachphase war der Gehalt des Wirkstoffes unter die Nachweisgrenze der Methode gesunken.



**Abbildung 65:** Verlauf der Maduramicin-Konzentration in Eigelb im 3. Teilversuch (Einzelwerte, Mittelwerte und Mediane für jeden Versuchstag)

### Qualitätskontrolle bei der Analyse der Eigelbproben

Für die Untersuchung von Eigelbproben stand kein Referenzmaterial zur Qualitätskontrolle, z. B. zur Kontrolle der Wiederfindungsraten, zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde für jede Analyse eine im mittleren Bereich der jeweiligen Kalibrierkurve dotierte Blank-Eigelbprobe als Positivkontrolle mitgeführt und die Wiederfindungsrate berechnet. Auf diese Weise konnte die Qualität der Analysen während der drei Teilversuche überprüft und miteinander verglichen werden. Die Werte wurden in eine zweiseitige Shewart Control Chart eingetragen. Die Toleranz- und Warngrenze der Qualitätskontrollkarte wurden anhand einer Testphase von 15 Analysen dotierter Eigelbproben ermittelt und sind in Tabelle 25 aufgelistet.

**Tabelle 25:** Grenzen der zweiseitigen Qualitätskontrollkarte (Shewart Control Chart) über die Wiederfindungsraten bei der Analyse der Eigelbproben

Parameter	Wiederfindungsrate in %
Mittelwert	99,0
untere Warngrenze	92,3
obere Warngrenze	105,8
untere Toleranzgrenze	89,0
obere Toleranzgrenze	109,1

Während der Analyse der Eigelbproben des gesamten Fütterungsversuches lagen die Wiederfindungsraten der Positivkontrollprobe innerhalb dieser Grenzen. Diese praktisch ermittelten Grenzen zeigen, dass die Methode die an Anforderungen an die Richtigkeit aus Entscheidung 2002/657/EG mit maximal erlaubten Abweichungen von -20 % bis +10 % bei Konzentrationen > 10 µg/kg erfüllt (Abschnitt 5.1.3).

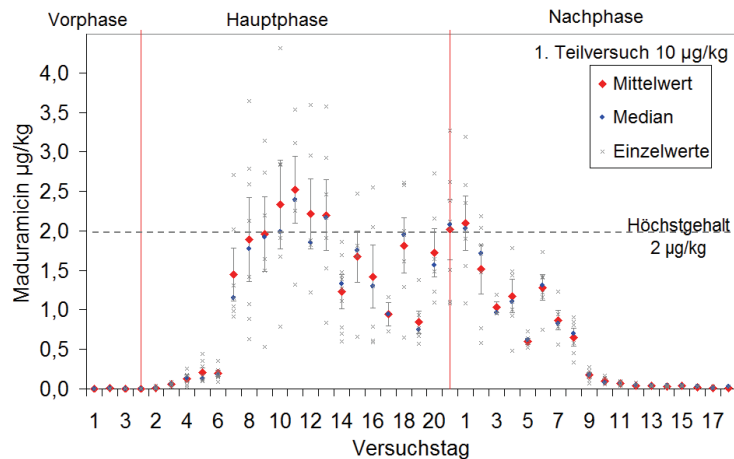
#### 5.2.7 Berechnung der Maduramicin-Gehalte im Gesamtei

Während des Versuches wurde von jedem Ei jeweils das Gewicht des Dotters und des Eiklars ermittelt. So konnte aus dem Gehalt von Maduramicin im Eigelb die Konzentration im Gesamtei berechnet werden.

#### Erster Teilversuch - 10 µg/kg-Futtermittel

Entsprechend dem Verhältnis der Masse des Eigelbs zum Gesamtei, betragen die Maduramicin-Gehalte im Gesamtei etwa ein Viertel der Gehalte im Eigelb. Beim ersten Teilversuch wurde am 11. Tag der Hauptphase ein Maximum von 2,5 µg/kg Maduramicin im Gesamtei (Abbildung 66) erreicht.

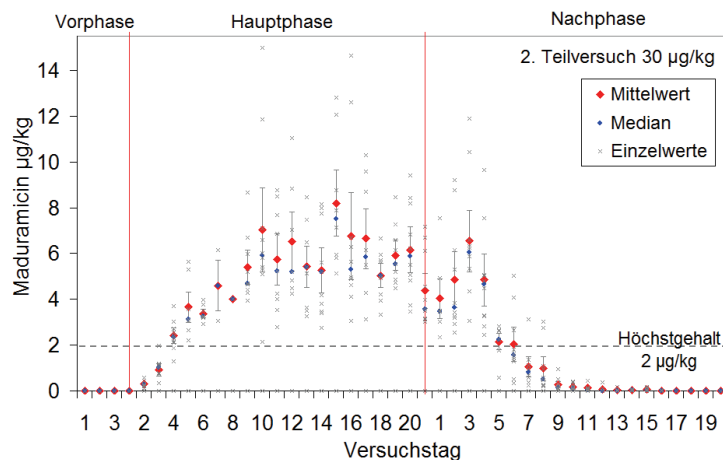
Mit dieser Konzentration wurde bereits der in VO (EG) Nr. 124/2009 festgelegte Höchstgehalt im Ei überschritten. In einzelnen Eiern wurden Gehalte über 4 µg/kg Maduramicin bestimmt.



**Abbildung 66:** Verlauf der Maduramicin-Konzentration im Gesamtei im 1. Teilversuch (Einzelwerte, Mittelwerte und Mediane für jeden Versuchstag)

### Zweiter Teilversuch - 30 µg/kg-Futtermittel

Der Verlauf der Maduramicin-Konzentration im Gesamtei bei Verabreichung von Futtermittel mit 30 µg/kg Maduramicin ist in Abbildung 67 dargestellt.

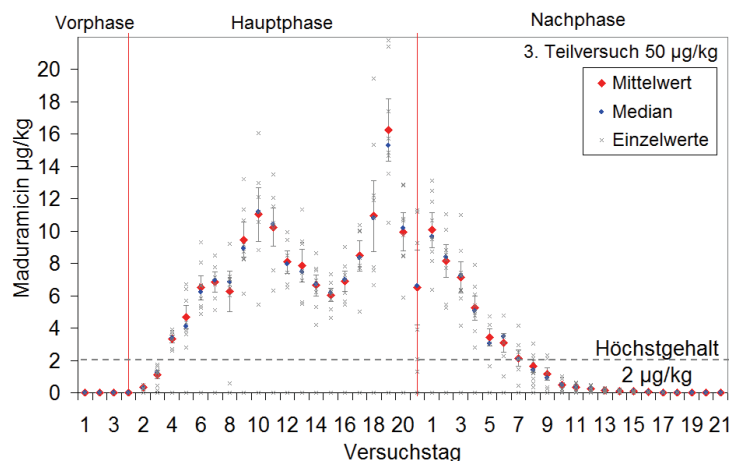


**Abbildung 67:** Verlauf der Maduramicin-Konzentration im Gesamtei im 2. Teilversuch (Einzelwerte, Mittelwerte und Mediane für jeden Versuchstag)

Bei diesem Teilversuch pendelte sich die Maduramicin-Konzentration nach 10 Fütterungstagen auf einen Wert von durchschnittlich 6,5 µg/kg ein. Am 15. Tag der Hauptphase wurde der höchste mittlere Maduramicin-Gehalt von 8,2 µg/kg bestimmt. Der höchste Gehalt einer einzelnen Eiprobe betrug ca. 15 µg/kg. Der festgelegte Höchstgehalt für Maduramicin im Ei von 2 µg/kg wurde 4 Tage nach Beginn der Verabreichung des Wirkstoffs überschritten und 7 Tage nach dem Absetzen wieder unterschritten.

### Dritter Teilversuch - 50 µg/kg-Futtermittel

Die Verabreichung des Futtermittels mit einer Maduramicin-Konzentration im Bereich des Höchstgehaltes, führte zu einem maximalen mittleren Gehalt von über 16 µg/kg Maduramicin im Gesamtei am 19. Tag der Hauptphase. Der Verlauf der Maduramicin-Konzentration (siehe Abbildung 68) weist zwei Maxima auf.



**Abbildung 68:** Verlauf der Maduramicin-Konzentration im Gesamtei im 3. Teilversuch (Einzelwerte, Mittelwerte und Mediane für jeden Versuchstag)

Am 10. Tag der Hauptphase wurden im Durchschnitt 11 µg/kg ermittelt, daraufhin sank die Konzentration bis auf 6 µg/kg am 15. Tag, um danach das zweite Maximum von 16 µg/kg am 19. Tag der Hauptphase zu erreichen. Wie beim zweiten Teilversuch wurde der Höchstgehalt 4 Tage nach der ersten Fütterung mit Maduramicin-haltigem Futter überschritten. Am 8. Tag der Nachphase sank der Maduramicin-Gehalt wieder unter den Höchstgehalt von 2 µg/kg.

#### 5.2.8 Ermittlung der Carry-over-Rate und des Transferfaktors

Die Carry-over-Rate ergibt sich aus der über das Futter aufgenommenen und der im Gleichgewichtszustand im Ei nachgewiesenen Menge Maduramicin. Zur Berechnung der Carry-over-Rate Maduramicins aus dem Futtermittel in das Hühnerei sind mehrere Annahmen erforderlich. Da keine Kontrolle über die von den einzelnen Tieren verbrauchte Futtermenge und keine Zuordnung der Eier zu einer Legehenne möglich war, wurde eine mittlere Carry-over-Rate für alle Hennen einer Gruppe berechnet. Als Gleichgewichtszustand wurde für alle drei Teilversuche der Zeitraum vom 10. bis 21. Tag der Hauptphase festgelegt. Von diesen Tagen wurde die mittlere absolute Maduramicin-Menge berechnet und mit der aufgenommenen Menge ins Verhältnis gesetzt. Zur Berechnung der aufgenommenen Maduramicin-Menge wurde die theoretische und zum Vergleich die in den Futtermittelproben ermittelte Menge verwendet. In Tabelle 26 sind die Carry-over-Raten der drei Teilversuche aus den Daten des Gleichgewichtszustands aufgetragen.

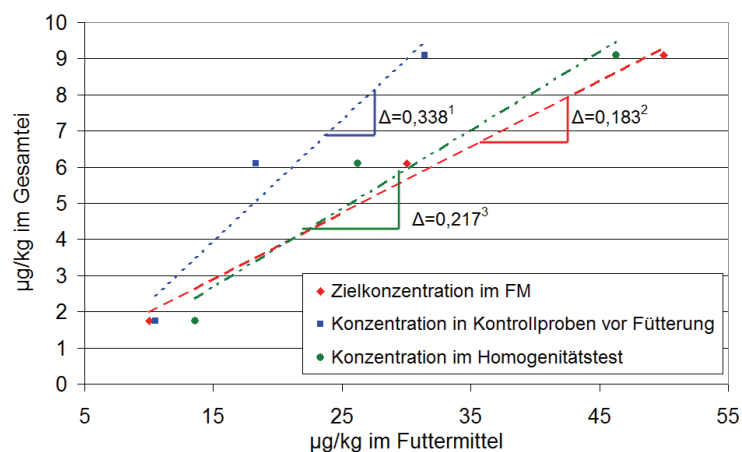
**Tabelle 26:** Ermittelte Carry-over-Raten in den drei Teilversuchen

Maduramicin-Aufnahme in $\mu\text{g}$ pro Legehenne pro Tag berechnet nach	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	
Ansatz 1	1,11	2,28	3,72	
Ansatz 2	1,03	3,72	5,78	
Ansatz 3	1,25	3,31	5,41	
Gleichgewichtskonzentration ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) im Gesamtei	1,75	6,10	9,09	
Carry-over-Rate (%)				Mittelwert
Ansatz 1	9,2	12,3	12,7	11,4
Ansatz 2	8,9	7,5	8,2	8,2
Ansatz 3	7,3	8,5	8,7	8,2

Die Carry-over-Raten unterscheiden sich in Abhängigkeit von der für die Berechnung verwendeten Maduramicin-Konzentration im Futtermittel. Ausgehend von der Soll-Konzentration liegen die Carry-over-Raten zwischen 7,5 % und 8,9 %. Es gibt keinen Trend mit zunehmender Maduramicin-Konzentration im Futtermittel. Im Gegensatz dazu steigt die Carry-over-Rate mit Zunahme der verabreichten Konzentration, wenn die Berechnung mit der tatsächlich ermittelten Konzentration im Futtermittel erfolgt. In diesem Fall sind die Carry-over-Raten mit 9,2 % bis 12,7 % insgesamt deutlich höher.

### Transferfaktor

Eine weitere Möglichkeit zur Betrachtung der Einlagerung von Maduramicin im Hühnerei ist die Berechnung der ins Ei übertragenen Konzentration pro Konzentrationseinheit Maduramicin im Futtermittel. Diese Größe wurde von Kennedy et al. [41] als Transferabilität bezeichnet. MacLachlan beschrieb sie als Transferfaktor [158]. Abbildung 69 zeigt die Korrelation der verabreichten Maduramicin-Konzentration zu der im Gleichgewichtszustand im Ei ermittelten Konzentration von Maduramicin. Die Steigung der Korrelationsfunktion entspricht dem Transferfaktor. Legt man für die Berechnung des Transferfaktors die in den Kontrollproben vor der Fütterung ermittelten Maduramicin-Konzentrationen (Ansatz 1) zugrunde, so ergibt sich ein Wert von  $0,338 \mu\text{g}$  Maduramicin/kg Ei pro  $\mu\text{g}$  Maduramicin / kg Futtermittel. Die nach Ansatz 2 (Zielkonzentration im Futtermittel) und Ansatz 3 (im Homogenitätstest ermittelte Maduramicin-Konzentration im Futtermittel) berechneten Transferfaktoren betragen 0,183 und  $0,227 \mu\text{g}$  Maduramicin / kg Gesamtei pro  $\mu\text{g}$  Maduramicin / kg Futtermittel.



**Abbildung 69:** Korrelation der verabreichten Maduramicin-Konzentration im Futtermittel zur Maduramicin-Konzentration im Gesamtei im Gleichgewichtszustand für die drei Annahmen der aufgenommenen Maduramicin-Menge. Die Indices 1, 2 und 3 bezeichnen den jeweiligen Berechnungsansatz, die Steigungen der Relationsfunktionen entsprechen den Transferfaktoren in  $\mu\text{g}$  Maduramicin/kg Gesamtei pro  $\mu\text{g}$  Maduramicin/kg Futtermittel.

### 5.2.9 Carry-over von Maduramicin im Vergleich zu anderen Kokzidiostatika

Für die Berechnung der aufgenommenen Maduramicin-Menge wurden im Vergleich die Sollkonzentration im Futtermittel als auch die ermittelten Konzentrationen eingesetzt. Die Carry-over-Raten, welche auf die theoretische Maduramicin-Konzentration im Futtermittel bezogen wurden, waren mit 7,5 % bis 8,9 % niedriger als diejenigen, welche über die mit LC-MS/MS bestimmten Konzentrationen im Futter berechnet wurden (9,2 % bis 12,7 %). Die Studien von Kennedy et al. zum Transfer von Lasalocid, Salinomycin und Monensin in das Hühnerei [38], [41] liefern keine Informationen bezüglich der aufgenommenen Menge an Futtermittel und damit an dem jeweiligen Wirkstoff. Die Berechnung einer Carry-over-Rate ist deshalb nicht möglich. Stattdessen beschreibt der Autor die transferierbare Wirkstoffmenge als übertragene Konzentration ins Ei pro Konzentrationsseinheit Kokzidiostatikum im Futtermittel. Diese Größe wird von MacLachlan [158] als Transferfaktor bezeichnet. Unter der Annahme der gleichen Aufnahmemenge wie im vorliegenden Versuch und einem durchschnittlichen Gewicht von 55 g pro Ei gingen Lasalocid zu ca. 2,9 %, Salinomycin zu 0,15 % und Monensin zu 0,006 % in das Hühnerei über. Als Transferfaktor ausgedrückt, handelt es sich hier um 0,063  $\mu\text{g/kg}$  Ei pro  $\mu\text{g/kg}$  Lasalocid, 0,003  $\mu\text{g/kg}$  Ei pro  $\mu\text{g/kg}$  Salinomycin, 0,0001  $\mu\text{g/kg}$  Ei pro  $\mu\text{g/kg}$  Monensin und 0,338, 0,183 bzw. 0,227  $\mu\text{g/kg}$  Ei pro  $\mu\text{g/kg}$  Maduramicin. Mit Hilfe dieser Größe ist eine Abschätzung darüber möglich, ob die Aufnahme eines Futtermittels, das einen Wirkstoff im Bereich des Höchstgehaltes enthält, eine Überschreitung des Höchstgehaltes im Hühnerei zur Folge haben kann. In Tabelle 27 wurde diese Möglichkeit für alle Kokzidiostatika mit bekannten Werten für deren Transferfaktoren berechnet.



**Tabelle 27:** Berechnung der Konzentration von Kokzidiostatika im Ei bei Aufnahme des Höchstgehaltes (HG) im Futtermittel (FM)

Kokzidio- statikum	Transferfaktor ( $\mu\text{g/kg}$ Ei pro $\mu\text{g/kg}$ FM)	vorausberechnete		vorausberechneter	
		HG im FM ( $\mu\text{g/kg}$ ) [7]	Konzentration im Ei ( $\mu\text{g/kg}$ ) bei Aufnahme des HG im FM	HG im Ei ( $\mu\text{g/kg}$ ) [8]	max. Gehalt im FM ( $\mu\text{g/kg}$ ) zur Einhaltung des HG im Ei
Maduramicin <sup>1</sup>	0,338	50	16,9	2 <sup>b</sup>	6
Maduramicin <sup>2</sup>	0,183	50	9,2	2 <sup>b</sup>	11
Maduramicin <sup>3</sup>	0,227	50	11,4	2 <sup>b</sup>	9
Lasalocid	0,063 [37]	1250	78,8	5	79
Salinomycin	0,003 [37]	700	2,3	3	-
Monensin	0,0001 [37]	1250	0,2	2	-
Narasin <sup>a</sup>	0,004 [137]	700	3	2	472
Halofuginon <sup>a</sup>	0,077 [135]	30	2,3	6	-
Nicarbazin <sup>a</sup>	0,051 [136]	500	25,6	100	-

<sup>1</sup> Transferfaktor berechnet nach Ansatz 1 (im FM ermittelte Konzentrationen)<sup>2</sup> Transferfaktor berechnet nach Ansatz 2 (theoretische Konzentration im FM)<sup>3</sup> Transferfaktor berechnet nach Ansatz 3 (Konzentration im FM bei Homogenitätstest)<sup>a</sup> Transferfaktor berechnet aus Literaturdaten<sup>b</sup> Höchstgehalt im Ei laut [8], wurde abgelöst durch [159]

Für Narasin wurde der Transferfaktor aus einem Datensatz Konzentration im Futtermittel zu Konzentration im Ei berechnet. Bei der Studie von Rokka et al. [137] wurde nur eine Konzentration verabreicht, sodass für die Berechnung des Transferfaktors die Korrelation der Konzentrationen vorausgesetzt wurde. Auf diese Weise wurde ein Wert von 0,004  $\mu\text{g/kg}$  Ei pro  $\mu\text{g/kg}$  ermittelt, welcher dem von Salinomycin ähnelt. Dies ist zu erwarten, da sich die beiden Substanzen lediglich um eine Methylgruppe unterscheiden.

Anhand der Transferfaktoren wurde berechnet, dass bei der Verfütterung von Futtermittel, welches den Höchstgehalt von Lasalocid bzw. Narasin die entsprechenden Höchstgehalte im Ei überschritten werden. Bei Monensin, Salinomycin und den chemischen Kokzidiostatika Halofuginon und Nicarbazin käme es nicht zur Überschreitung des Höchstgehaltes. Auch für Maduramicin wurde anhand der drei Transferfaktoren die bei Aufnahme der Höchstgehaltskonzentration im Futtermittel ins Ei übertragene Maduramicin-Konzentration berechnet (siehe Tabelle 27). Eine eindeutige Aussage über den tatsächlichen Übergang von Maduramicin aus dem Futtermittel in das Ei kann nicht getroffen werden. Die Ergebnisse zeigen dennoch, dass in jedem Fall der Höchstgehalt im Ei selbst dann überschritten wird, wenn Futtermittel mit Verschleppungen an Maduramicin unter dem zugelassenen Höchstgehalt an Legehennen verfüttert wird. Die tatsäch-

lichen Carry-over-Raten und Transferfaktoren für den Übergang eines Wirkstoffes aus dem Futtermittel in das Hühnerei lassen sich unter den gegebenen Bedingungen nicht ermitteln. Dazu wäre die Haltung der Versuchstiere in Einzelkäfigen und die Fütterung über eine Magensonde erforderlich. Auf diese Art wären eine sichere Aussage über die Aufnahmemenge des Wirkstoffs und, durch die Zuordnung der gelegten Eier zur Henne, über die ins Ei übergegangene Wirkstoffmenge möglich.

Der im Vergleich zu den anderen Kokzidiostatika hohe Übergang von Maduramicin aus dem Futtermittel in das Hühnerei ist unter anderem auf die Lipophilie des Wirkstoffes zurückzuführen, welche die höchste in der Gruppe der Ionophore ist. Dies zeigt sich auch bei der Aufnahmedauer, nach welcher die Gleichgewichtskonzentration im Ei erreicht wird. Die weniger lipophilen Kokzidiostatika Monensin, Lasalocid und Salinomycin erreichen bereits nach sechs, sieben und neun Tagen ein Konzentrationsplateau im Ei. Die Dosierung von Maduramicin für Zieltierarten gegen Kokzidiose ist mit 5 mg/kg Futtermittel im Vergleich zu den anderen ionophoren Kokzidiostatika mit bis zu 125 mg/kg Futtermittel gering. Die Aufnahmerate von Maduramicin in die Parasitenzellen ist offensichtlich ebenfalls höher, wie auch die Aufnahme in die Zellen des Hühnereis.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Der prophylaktische Einsatz von Kokzidiostatika hat eine große wirtschaftliche Bedeutung in der Geflügelproduktion. Die Verwendung der Wirkstoffe darf jedoch keine Gefährdung der Gesundheit von Tier und Mensch zur Folge haben. Amtliche Kontrollen von Futtermitteln für Nicht-Zieltierarten und Lebensmitteln tierischen Ursprungs auf Kontaminationen oder Rückstände von Kokzidiostatika sind deshalb erforderlich. Seit mehreren Jahrzehnten können Kokzidiostatika mit verschiedensten Analysetechniken in Futtermitteln und in Lebensmitteln tierischen Ursprungs nachgewiesen werden. Heute werden Sie hauptsächlich mittels LC-MS/MS nachgewiesen und quantifiziert. Obwohl einige in-house validierte Methoden zur Bestimmung von Kokzidiostatika publiziert wurden, gibt es bis heute keine standardisierten Multimethoden für die Bestimmung aller als Futtermittelzusatzstoffe zugelassenen Kokzidiostatika in den verschiedenen Matrices. Bis heute sind daher laut EFSA [17–20,22–24,26–28,160] nur wenige Daten zum Übergang von Kokzidiostatika aus Futtermitteln in tierische Lebensmittel und zum Vorkommen der Substanzen in tierischen Matrices vorhanden. Eine der möglichen Ursachen dafür sind Schwierigkeiten bei der Kokzidiostatika-Analytik, die zum großen Teil durch Matrixeffekte bei der LC-MS/MS-Messung in den komplexen Probenmaterialien zurückzuführen sind.

Matrixeffekte, die bei der LC-MS/MS-Analyse von Kokzidiostatika in Futtermittel, Eiweiß, Eigelb und Gesamtei sowie von CBX und OQX in Futtermittel auftreten, wurden systematisch untersucht. Dabei wurden mögliche Einflussfaktoren wie Matrix, Analyt, Extraktion (Technik und Lösungsmittel), Probenaufreinigung, chromatographische und massenspektrometrische Messbedingungen berücksichtigt. Unabhängig von der Probenaufarbeitung war häufiger Signalsuppression als Signalverstärkung zu beobachten, was die Ergebnisse aus der Literatur [119,149,150] bestätigt. Die negativ ionisierten Analyten waren trotz der höheren Selektivität der negativen gegenüber der positiven Ionisation [123], gleichermaßen von Matrixeffekten betroffen wie die positiv ionisierten Substanzen.

Der Einfluss des Extraktionsschrittes wurde am Beispiel der Matrix Futtermittel für alle Analyten erörtert. ASE, konventionelle Schüttelextraktion und Ultraschallextraktion wurden mit den in der Literatur häufig verwendeten Lösungsmitteln Acetonitril und Methanol sowie Kombinationen der beiden mit und ohne Wasser verglichen. Es kann keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob der Matrixeffekt auf die Analyten stärker durch den Wechsel der Extraktionstechnik oder des Extraktionslösungsmittels verändert wird. Je nach Analyt hatte einer der beiden Faktoren einen stärkeren, oder beide einen ähnlich starken, Einfluss. Der Vergleich der Matrixeffektprofile eines Analyten für alle Extraktionsvarianten zeigte zur entsprechenden Retentionszeit des Analyten Schwankungen des Matrixeffektes um bis zu  $\pm 22\%$ . Bei Betrachtung der Matrixeffektprofile über den gesamten HPLC-Lauf war für die ASE meist die stärkste Signalsuppression zu beobachten. Dies ist durch die erhöhte Extraktionsausbeute, auch an Störkomponenten, durch den erhöhten Druck und die Temperatur bei der ASE gegenüber der Schüttelextraktion und der Ultraschallextraktion zu erklären. [161]

Die Ursache von Matrixeffekten sind mit den Analyten coeluiierende Substanzen, welche die Ionisationseffizienz der Analyten beeinflussen. Daraus folgt, dass der auf ver-

schiedene Analyten wirkende Matrixeffekt zunächst von der jeweiligen Retentionszeit abhängig ist. Die Matrixeffektprofile verschiedener Analyten in einer Messung verliefen meist ähnlich, wie auch von Stahnke et al. [142] beschrieben. In einzelnen Retentionsbereichen sind die Matrixeffekte in Abhängigkeit vom Analyten stärker oder schwächer ausgeprägt. In einigen Fällen treten analytabhängig sehr schmale, „peak“-ähnliche Bereiche der Signalsuppression oder -verstärkung auf. Liegen diese im Retentionsbereich des Analyten, kann es bei Schwankungen des chromatographischen Systems zu Matrixeffektänderungen innerhalb einer Messsequenz oder zwischen zwei Sequenzen kommen. Dies kann zur Beeinträchtigung der Präzision einer Analysenmethode führen.

Die verschiedenen Matrixeffekte von Futtermittel und Ei wurden in Kapitel 4.1.3 gegenübergestellt. Erwartungsgemäß traten in Eiweiß deutlich schwächere Matrixeffekte auf als in den komplexen Matrices Eigelb, Gesamtei und Futtermittel. Die Matrixeffekte verschiedener Alleinfuttermittel unterschieden sich kaum voneinander. Daraus folgt, dass die Matrixkalibrierung zur Quantifizierung in verschiedenen Futtermitteln mit analytfreien Futtermitteln, auch für andere Tierarten, vorgenommen werden kann. Davon ausgenommen sind Spezialfuttermittel wie beispielsweise Mineralfutter. Des Weiteren wurde festgestellt, dass das Alter einer Probe ebenfalls Einfluss auf den Matrixeffekt haben kann. Die Extrakte vom Eigelb unterschiedlich alter Eier wiesen deutliche Unterschiede in ihren Matrixeffektprofilen auf. Dieses Erkenntnis ist bei der Auswahl des Blankmaterials zur Matrixkalibrierung zu beachten, Proben und Blankmaterial sollten möglichst ähnlich alt sein.

Zur Reduktion von Matrixeffekten bei der Analyse von Kokzidiostatika in Futtermittel und Ei, sowie von CBX und OQX in Futtermittel, wurden verschiedene Strategien (Flüssig-Flüssig-Extraktion, Festphasenextraktion, Extraktverdünnung) verglichen. Durch die Verdünnung von Probenextrakten (am Beispiel CBX und OQX) konnten Matrixeffekte deutlich verringert werden. Der „dilute and shoot“-Ansatz ist bei ausreichender Analytkonzentration empfehlenswert. In aktuellen Arbeiten in der Pestizidanalytik [162,163] wurden Matrixeffekte von 80 % durch Verdünnung um Faktor 25 bis 40 auf unter 20 % gesenkt. Solche hohen Verdünnungsfaktoren sind zur Bestimmung von Kokzidiostatika im einstelligen µg/kg-Bereich in Futtermittel und in Ei nicht anwendbar.

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion von Futtermittelextrakten mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln führte nicht zur Reduktion des Matrixeffektes auf CBX und OQX. Die dispersive SPE mit RP18-Material oder mit Aktivkohle wurde zur Aufreinigung von Futtermitteln, von Eiweiß und Gesamtei für die Kokzidiostatika-Multimethode getestet. Mit der Aktivkohlephase traten starke Verluste der chemischen Kokzidiostatika auf. Ursache ist die starke Adsorption der aromatischen Strukturen an der Aktivkohle aufgrund von *pi-pi*-Wechselwirkungen. Das C18-dSPE-Material konnte bei akzeptablen Wiederfindungsraten den Matrixeffekt von Futtermittel auf alle Kokzidiostatika verringern, in den Eimatrices war damit keine deutliche Reduktion des Matrixeffektes möglich.

Mit dem Ziel, die Nachweisgrenze der Methode im Futtermittel herabzusetzen, wurden zum einen die dSPE-gereinigten Extrakte eingengt und zum anderen ein reduziertes Extraktvolumen (3 ml anstelle von 6 ml) zur Reinigung eingesetzt. Die Erhöhung der Matrixkonzentration der gereinigten Endextrakte durch Einengen bewirkte unterschiedlich starke Erhöhungen der Matrixeffekte in Abhängigkeit vom Analyten. Mit geringerem

Extraktvolumen im dSPE-Röhrchen konnte der Matrixeffekt nicht reduziert werden, er wurde z. T. sogar erhöht.

Eine mögliche Erklärung dafür und für die z. T. überproportionale Zunahme des Matrixeffektes durch Aufkonzentrierung sind exogen eingetragene Störsubstanzen. Diese auch in anderen Arbeiten [124,126] diskutierte Annahme wurde für die Kokzidiostatika-Multimethode durch Behandlung reinen Lösungsmittels mit dSPE geprüft. Post extraction addition Experimente mit dSPE ohne Probenmaterial zeigten, dass aus der Festphase extrahierten Bestandteile zu einer deutlichen Suppression der Analytsignale führt. Dies trat gleichermaßen bei der C18- und der Aktivkohle-Festphase auf. Die Signalunterdrückung war bei 3 ml Extraktvolumen stärker als bei 6 ml, da die gleiche Menge exogener Komponenten in die Hälfte des Volumens übergingen. Durch die höhere Konzentration an störenden Substanzen nahm auch der Matrixeffekt zu. Die ohne Probenmaterial ermittelten Matrixeffekte können nicht direkt auf Experimente in Matrix übertragen werden, da die Wechselwirkungen von Probe, Festphase und Analyt berücksichtigt werden müssen. Im Verhältnis zum Anteil der Matrixkomponenten liegen geringere Mengen exogener Substanzen im Endextrakt vor, sodass deren Einfluss geringer einzustufen ist. Am Beispiel der Probenaufarbeitung für die Bestimmung von CBX und OQX wurden Matrixeffektprofile behandelter Lösungsmittel erstellt. Sowohl durch die ASE, als auch durch den Clean-up-Schritt mit SPE (Oasis HLB) wurden Substanzen eingetragen, die zur Verstärkung oder zur Suppression der Analytsignale führte.

Die Reinigung von Futtermittelextrakten mit RP-SPE-Kartuschen auf Polymerbasis konnte den Matrixeffekt nur zum Teil reduzieren. Das Strata X Material zeigte bei der Analyse von Kokzidiostatika etwas bessere Ergebnisse als die Oasis HLB SPE, wobei der Einfluss der Festphasen auf den Matrixeffekt in Abhängigkeit vom Analyten sehr unterschiedlich ausfiel. Der Matrixeffekt von Futtermittel auf CBX und OQX wurde durch die Reinigung mit der Oasis HLB SPE nicht oder nur geringfügig reduziert. Zur Reinigung von Eigelbextrakten für die Bestimmung von Maduramicin wurde eine mit Zirkonium belegte RP-Phase verwendet. Im Matrixeffektprofil Maduramicins war keine Verbesserung durch die SPE zu erkennen, jedoch wurden die Matrixeffektprofile von Analyt und internem Standard im Vergleich zum Rohextrakt angeglichen. Für die Präzision der Methode kann dies von Vorteil sein.

Ein weiteres Trennprinzip wurde zur Aufreinigung von Futtermittelextrakten untersucht. Mittels Größenausschlusschromatographie wurde ein Futtermittel-Rohextrakt und ein mit dSPE PSA C18 vorgereinigter Extrakt fraktioniert. Der Reinigungseffekt war in Abhängigkeit vom Analyten sehr unterschiedlich. Außerdem lieferten post extraction addition und PCI gegensätzliche Ergebnisse. Ohne vorherige dSPE war der mit der post extraction addition ermittelte Matrixeffekt mit bis zu - 85 % stärker als im Rohextrakt. Die Signalsuppression konnte durch die Vorreinigung mit der dSPE reduziert werden, war aber dennoch höher als ohne Fraktionierung. Im Gegensatz dazu stehen die mittels PCI ermittelten Matrixeffektprofile. In Kombination mit der dSPE als Vorreinigungsschritt waren lediglich schwache bzw. keine Matrixeffekte zur Retentionszeit der Analyten zu beobachten. Die Kombination von verschiedenen Trennsystemen wird auch in der Literatur als erfolgversprechende Methode zur Reduktion von Matrixeffekten beschrieben [164]. Nachteilig ist jedoch der hohe Aufwand dieser Fraktionierungsmethode. Mithilfe

eines Säulenschaltventils könnte die Größenausschlussfraktionierung in die LC-MS/MS-Analyse integriert und somit beide Schritte zu einer 2D-LC-Methode zusammengefasst werden.

Die gegensätzlichen Ergebnisse von post extraction addition und PCI zeigen, dass die Matrixeffektuntersuchungen allein keine ausreichende Aussagekraft über die Leistungsfähigkeit einer Analysenmethode haben. Sie sind hilfreiche Werkzeuge für die Methodenentwicklung und bei Beantwortung konkreter Fragestellungen. Letztendlich sind die erzeugten Daten im Zusammenhang mit Methodenvalidierungsdaten oder Analyseergebnissen zu sehen.

Für die Validierung einer Kokzidiostatika-Multimethode hat sich aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der Analyten keine der getesteten Aufreinigungsmethoden als optimal erwiesen. Matrixeffekte wurden in Abhängigkeit vom Analyten nur teilweise oder sehr unterschiedlich reduziert. Mit der Reinigung gingen außerdem meist größere Analytverluste einher, sodass für die Validierung lediglich ein Filtrationsschritt gewählt wurde. Die Verdünnung der Futtermittelextrakte ist nur unter Umständen möglich, da aufgrund der festgelegten Höchstgehalte im Futtermittel große Unterschiede zwischen den Zielkonzentration der einzelnen Kokzidiostatika bestehen. Auch für die Bestimmung von Maduramicin in Futtermittel- und Eiweißproben des Carry-over-Versuches wurde auf einen Probenaufreinigungsschritt verzichtet.

Neben der Probenaufarbeitung wurden auch die Messung selbst betreffende Faktoren hinsichtlich ihres Einflusses auf den Matrixeffekt untersucht. Mit zwei verschiedenen LC-MS/MS-Geräten mit unterschiedlichem Quellendesign wurden, wie in anderen Arbeiten [128], ähnliche Matrixeffekte beobachtet. Verschiedene Addukt-Ionen eines Moleküls können unterschiedlich stark von Matrixeffekten betroffen sein, wie am Beispiel der Detektion von Monensin als Natrium- und Ammonium-Addukt gezeigt wurde.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung des Carry-over des Kokzidiostatikums Maduramicin aus dem Futtermittel in das Hühnerei. Dazu gab es bisher keine gesicherten experimentellen Daten. Der Übergang von Maduramicin in das Ei der Legehennen aus Futtermitteln mit Gehalten bis zur maximal erlaubten Verschleppungskonzentration für Nicht-Zieltierarten wurde charakterisiert und quantifiziert. Maduramicin ging nahezu ausschließlich in das Eigelb über, während der Transfer in das Eiweiß vernachlässigbar war. Im Vergleich zu anderen ionophoren Kokzidiostatika geht ein um ein vielfaches höherer Anteil von Maduramicin aus dem Futtermittel in das Ei über. Die ermittelte Carry-over-Rate betrug in Abhängigkeit von der zugrunde gelegten Annahme zur aufgenommenen Maduramicin-Menge zwischen 8 % und 11 %, der Transferfaktor betrug zwischen 0,183 und 0,338 µg Maduramicin pro kg Ei pro µg Maduramicin je kg des aufgenommenen Futtermittels.

Die Erkenntnisse aus dem Carry-over-Versuch wurden bei der Überprüfung der Vorschriften im Anhang der Richtlinie 2009/8/EG [7] und der Verordnung (EG) Nr. 124/2009 [8] berücksichtigt. Die dort festgelegten Höchstgehalte sollten aufeinander abgestimmt werden. Bei der Fütterung von Legehennen mit einem Futter, welches den Vorschriften der Richtlinie 2009/8/EG entspricht, sollte die Sicherheit bestehen, dass die produzierten Eier die Festlegungen der Verordnung (EG) Nr. 124/2009 erfüllen. Die

Anpassung eines der beiden Höchstgehalte der betroffenen Kokzidiostatika war deshalb erforderlich. Diese erforderte jedoch eine gründliche Erörterung der Folgen. Eine Senkung der Höchstgehalte für die Verschleppung könnte zu wirtschaftlichen Verlusten für die Futtermittelproduktion führen. Mehrere Chargen von Futtermittel, welches nach der Herstellung von Kokzidiostatika-haltigem Futtermittel gemischt wird, müssten verworfen und entsorgt werden, um die Produktionslinie ausreichend zu spülen. Anderenfalls wäre eine strikte Trennung der Mischung von wirkstoffhaltigem und wirkstofffreiem Futter nötig, sodass in zusätzliche Anlagen investiert werden müsste bzw. eine Spezialisierung der Produzenten auf eine der Varianten erfolgen müsste. Dies wäre jedoch wirtschaftlich unrentabel. Ein weiterer Ansatz zur Reduktion von Verschleppungen ist die Verbesserung der physikalischen Eigenschaften der Wirkstoff-Formulierungen. Für Lasalocid konnte durch die Entwicklung einer Granulat-Form bereits eine deutlich verminderte Verschleppungsrate erzielt werden [37]. Diese Möglichkeit ist gerade dann erfolgversprechend, wenn der Höchstgehalt nur geringfügig herabgesetzt werden müsste, wie im Fall von Narasin, wo eine Reduktion um ein Drittel ausreichend wäre.

Die maximal erlaubte Verschleppung von Lasalocid und Maduramicin müsste um den Faktor 5 bzw. Faktor 16 reduziert werden, um den Höchstgehalt im Ei von 5 µg/kg bzw. 2 µg/kg einzuhalten. Dafür wäre ein wirtschaftlich unattraktiver Aufwand erforderlich. Eine Erhöhung der Höchstgehalte im Ei wurde im Sinne des Verbraucherschutzes geprüft. Die EFSA hatte 2007 und 2008 eine gesundheitsschädliche Wirkung bei Verbrauchern durch eine Exposition gegenüber Kokzidiostatika-Rückständen in tierischen Lebensmitteln aufgrund bis zur 10 % kreuzkontaminierter Futtermittel als unwahrscheinlich eingestuft. Eine aus verschleppungsbedingten Maduramicin-Rückständen resultierende Überschreitung des festgelegten ADI-Wertes von 1 µg/kg pro kg Körpergewicht pro Tag wurde ausgeschlossen [22]. Die im Carry-over-Versuch ermittelte durchschnittliche Maduramicin-Konzentration in Eiern bei Fütterung des erlaubten Höchstgehaltes (50 µg/kg Futtermittel) für Nicht-Zieltierarten betrug 9 µg/kg Ei. Der tägliche Verzehr von einem Ei (Durchschnittsgewicht 60 g), welches diese Konzentration enthält, würde zu einer Aufnahme von 0,54 µg/Person/Tag bzw. 0,009 µg/kg KG/Tag bei einer 60 kg schweren Person führen. Die Ausschöpfung des ADI betrüge 0,9 %.

Der Höchstgehalt von Maduramicin in Hühnerei wurde deshalb durch die Verordnung (EU) Nr. 610/2012 [159] auf 12 µg Maduramicin pro kg Gesamtei erhöht. Bei einer Ausschöpfung von 1,2 % des ADI im Falle einer durchschnittlichen täglichen Verzehrsmenge von einem Ei mit einem Maduramicin-Gehalt von 12 µg/kg wurde eine gesundheitliche Gefährdung des Verbrauchers ausgeschlossen. Tatsächlich ist die durchschnittliche Verzehrsmenge von Eiern deutlich niedriger. Laut der in der Nationalen Verzehrsstudie II [165] erhobenen Daten werden in Deutschland 17 g (Frauen) bis 21 g (Männer) Ei inklusive der daraus hergestellten Gerichte verzehrt. Somit ist die Exposition gegenüber Maduramicin aus Eiern aufgrund von kreuzkontaminiertem Futter für Legehennen noch geringer einzustufen. Andere tierische Lebensmittel wie Geflügel-, Rind- und Schweinefleisch stellen laut der Ergebnisse des Nationalen Rückstandskontrollplans, zumindest in Deutschland, ebenfalls keine entscheidende Expositionsquelle für Maduramicin dar. Im Jahr 2011 wurde in keiner der im Rahmen des NRKP [166] untersuchten Fleisch- und Eiprobe Maduramicin nachgewiesen.

Weitere Untersuchungen des Carry-over anderer ionophorer Kokzidiostatika aus Futtermitteln mit Konzentrationen im Bereich der maximal erlaubten Verschleppung in Futtermittel für Nicht-Zieltierarten wurden in Folge dieser Studie durchgeführt.



## 7 Material und Methoden

Während der Analyse wurden, wenn nicht anders angegeben, Chemikalien des Reinheitsgrades p. A., Lösungsmittel der Reinheit HPLC grade und Reinstwasser verwendet.

### 7.1 Lösungsmittel und Chemikalien

- Ammoniumacetat p. A. Eluent additive for LC/MS (Fluka), CAS Nr.: 631-61-8
- Ammoniumformiat p. A. (VWR), CAS Nr.: 540-69-2
- Essigsäure 100 % p. A. (Roth), CAS Nr.: 64-19-7
- Ameisensäure p. A. (Merck), CAS Nr.: 64-18-6
- Acetonitril für LC/MS (Merck), CAS Nr.: 75-05-8
- MeOH Lichrosolv für LC/MS (Merck), CAS Nr.: 67-56-1

### 7.2 Standardsubstanzen

#### Kokzidiostatika

- Decoquinat 99,6 % (Rhône-Poulenc, z. V. gestellt vom BVL), CAS Nr.: 18507-89-6
- Diclazuril 98,5 % (Dr. Ehrenstorfer), CAS Nr.: 101831-37-2
- Ethopabat 98,5 % (Dr. Ehrenstorfer), CAS Nr.: 59-06-3
- Maduramicin Ammonium Salt 91,0 % (Dr. Ehrenstorfer), CAS Nr.: 84878-61-5
- Monensin Sodium Salt 94,2 % (Sigma), CAS Nr.: 17090-79-8
- Narasin from *Streptomyces auriofaciens* 97,0 % (Sigma-Aldrich), CAS Nr.: 55134-13-9
- Nicarbazin 99,9 % (Sigma-Aldrich), CAS Nr.: 330-95-0
- Robenidin Hydrochlorid 97,1 % (Sigma), CAS Nr.: 25878-50-7
- Salinomycin SV Sodium Salt 2,5 Hydrat 94,4 % (Sigma), CAS Nr.: 55721-31-8
- Semduramicin Sodium 96,8 % (Exygen. Phibro, z. V. gestellt vom BVL), CAS Nr.: 119068-77-8

#### interne Standardsubstanzen für Kokzidiostatika

- Diclazuril-bis 97,2 % (Janssen Pharmaceutica – Fitzgerald Ind.), CAS Nr.: - (R062646)
- 4,4'-Dinitrocarbanilid-d<sub>8</sub> 99,0 % (Witega), CAS Nr. (4,4'-Dinitrocarbanilid): 587-90-6
- <sup>13</sup>C<sub>12</sub>-4,4'-Dinitrocarbanilid >99 % (Witega), CAS Nr. (4,4'-Dinitrocarbanilid): 587-90-6
- Decoquinat-d<sub>5</sub> > 98 % (Witega), CAS Nr. (Decoquinat): 18507-89-6
- Robenidin-d<sub>8</sub> > 95 % (Witega), CAS Nr. (Robenidin Hydrochlorid): 25878-50-7
- Nigericin Sodium Salt from *Streptomyces hygroscopicus* 98,0 % (Fluka), CAS Nr.: 28643-80-3 (Aufbewahrung unter Argon)

#### Carbadox und Olaquinox

- Carbadox > 99 % (Sigma), CAS -Nr. : 6804-07-5
- Olaquinox > 95,8 % (Sigma-Aldrich), CAS-Nr. : 23696-28-8

### 7.3 Lösungen

- Stammlösungen S0 = 1 mg/ml  
10 mg Standardsubstanz im 10 ml-Messkolben einwiegen, mit Lösungsmittel zur Marke auffüllen, durch Schütteln oder im Ultraschallbad vollständig lösen
- verdünnte Standardlösungen S1, S2, S3, S4, S5, S6  
weitere Verdünnungen jeweils in 1:10-Verdünnungsschritten ansetzen  
S1=100 ng/µl; S2=10 ng/µl; S3=1 ng/µl; S4=100 pg/µl; S5=10 pg/µl; S6=1 pg/µl. . .
- Fließmittel für LC-MS/MS-Multimethode  
Eluent A: 5 mM Ammoniumacetatpuffer 0,5 % Essigsäure (V/V)  
0,395 g Ammoniumacetat im 1 l-Messkolben mit 5 ml Essigsäure versetzen, mit Reinstwasser bis zur Marke auffüllen  
Eluent B: Acetonitril mit 1 % Fließmittel A (V/V), 0,5 % Essigsäure (V/V)  
10 ml Fließmittel A im 1 l-Messkolben mit 5 ml Essigsäure versetzen, mit Acetonitril zur Marke auffüllen
- Eluentgemisch für LC-MS/MS-Multimethode (Acetonitril-Reinstwasser 3+7)  
3 Teile Acetonitril und 7 Teile Reinstwasser im Messzylinder getrennt abmessen, in geeignetem Gefäß mischen
- Fließmittel für Maduramicin-Methode  
Eluent A: Ammoniumacetat-Puffer 5 mM  
0,385 g Ammoniumacetat im 1 l-Messkolben einwiegen, mit Reinstwasser (4.2.5) bis zur Marke auffüllen  
Eluent B: Acetonitril mit 1 % Ammoniumacetat-Puffer (V/V)  
10 ml 5 mM Ammoniumacetatpuffer werden im 1 l-Messkolben mit Acetonitril bis zur Marke auffüllen
- Extraktionslösung Acetonitril mit 1 % Ameisensäure (V/V)  
10 ml Ameisensäure im 1 l-Messkolben mit Acetonitril bis zur Marke auffüllen
- Eluentgemisch für Maduramicin-Methode (Acetonitril-Reinstwasser 9+1)  
9 Teile Acetonitril und 1 Teil Reinstwasser im Messzylinder getrennt abmessen, in geeignetem Gefäß mischen
- Fließmittel für Carbadox und Olaquinox  
Eluent A: 10 mM Ammoniumformiat  
0,631 g Ammoniumformiat im 1 l-Messkolben einwiegen, mit Reinstwasser (4.2.5) bis zur Marke auffüllen  
Eluent B: Methanol

### 7.4 Probenmaterial

- Futtermittel TÜK TÜK Alleinfuttermittel für Legehennen
- Futtermittel für Legehennen (Pellets)
- Futtermittel für Legehennen (Getreide)
- Alleinfuttermittel für Schweine
- Ferkel-Aufzuchtfutter
- Milchleistungsfutter

- Eiprobe für Methodenentwicklung und –validierung sowie für die Untersuchung von Matrixeffekten von Legehennen des Versuchsgutes des Bundesinstituts für Risikobewertung in Berlin Marienfelde

## 7.5 Geräte

- LC-MS/MS 1 (API 4000 QTrap)
  - Agilent 1100/1200 mit Degasser, Cap Pump, Säulenofen, Autosampler, Autosampler Thermostat, Steuermodul
  - Applied Biosystems QTrap 4000 Triple Quadrupol Massenspektrometer mit linearer Ionenfalle
- LC-MS/MS 2 (TSQ Vantage)
  - Accela Pump 1250, HTC PAL Autosampler
  - MayLab Mistra Switch Säulenschaltventil und Säulenofen
  - Thermo TSQ Vantage Triple Quadrupol Massenspektrometer
- HPLC für Fraktionierung
  - Agilent 1100 mit Degasser, Cap Pump, Säulenofen, Autosampler, UV-Detektor, Fraktionssammler
- Isokratische Hilfspumpe: Dionex isoPump P568
- Dionex Accelerated Solvent Extractor ASE 200 mit Solvent Controller und Compressor Modell 6-4
- Mischgerät REAX-2 (Heidolph)
- Ultraschallbad Sonorex RK 255 Transistor (Bandelin)
- Vortex MS3 digital (IKA)
- TCS-Probenaufarbeitungssystem vapoTherm basis (Labortechnik Barkey)
- Ultra Turax TP-18/10 (Labortechnik Janke & Kunkel)
- SPE-Block (Phenomenex)
- Analysenwaage AE200/9 (Mettler)
- Analysenwaage ME235S (Sartorius)
- variable Kolbenhubpipetten (Eppendorf)
- Mühle ZM 100 (Retsch)
- Tischzentrifuge RT 7 (Thermo Scientific)
- Zentrifuge für 2 ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf)

## 7.6 Verbrauchsmaterial

- Pasteurpipetten 150 mm Kalk-Soda-Glas (VWR)
- dispersive SPE-Röhrchen PSA/Envi-Carb SPE Clean-Up Tube 2 (SUPELCO)
- dispersive SPE-Röhrchen PSA/C18 SPE Clean-Up Tube 1 (SUPELCO)
- SPE-Kartuschen Strata-X 33 µm Polymeric Reversed Phase 200 mg/3 ml (Phenomenex)
- SPE-Kartuschen Oasis HLB 3cc 60 mg/2 ml (Waters)

- Hybrid-SPE-Precipitation Kartuschen 30 mg/ 1ml (SUPELCO)
- HPLC-Säule Hypersil Gold C8 100 mm x 2,1 mm, 3 µm (Thermo)
- Vorsäule direct coupled Javelin Design 10 mm x 2,1 mm, 3 µm (Thermo)
- HPLC-Säule Luna 3u C8 (2) 100A 100 mm x 2 mm, 3 µm (Phenomenex)
- HPLC-Säule Biobasic SEC-300 100 mm x 2,1 mm, 5 µm, 300 Å (Thermo)
- HPLC-Säule Ascentis Express C18 150 x 4,6 mm, 2,7 µm und Voräulenfilter Column Saver 0,5 µm (Supelco)
- HPLC-Säule Luna Aqua 3 u C18 125 A 75 x 2,0 mm, 3 µm und Security Guard Cartridges AQ C18 4 mm x 2,0 mm (Phenomenex)
- HPLC-Säule Luna 3 u HILIC 150 x 3,0 mm, 3 µm und Security Guard Cartridges HILIC 4 mm x 2,0 mm (Phenomenex)
- Messkolben Klasse A
- Zentrifugalfilter modifiziertes Nylon 0,2 µm und 0,45µm, 500 µl (VWR)
- Reagenzgläser 10 ml Rundboden/Spitzboden NS 14,5
- PE-Zentrifugenröhrchen 50 ml Schraubverschluss (Labcon)
- ASE-Vials 60 ml, Schraubverschluss mit Septum (I-CHEM)
- Zellulosefilter für ASE-Zellen d=1,983 cm (Dionex)
- Autosampler-Vials 2 ml mit Rollrand (Omnilab)
- Rollrand-Deckel mit Teflon-Silicon-Teflon-Septum (Omnilab)
- gasdichte Spritzen mit Luer-Lock-Adapter 1 ml, 5 ml (Hamilton)

## 7.7 Methodenparameter

### LC-MS/MS-Multimethode für 11 Kokzidiostatika (API 4000 QTrap)

**Tabelle 28:** HPLC-Parameter der Kokzidiostatika-Multimethode (API 4000)

Injektionsvolumen	5 µl	
Nadelwaschprogramm	nach Injektion 3x Eintauchen in LSM	
Temperatur Autosampler	Raumtemperatur (21 °C)	
Fluss	200 µl/min	
Temperatur Säulenofen	50 °C	
<hr/>		
Zeit (min)	Eluent A <sup>a</sup> (%)	Eluent B <sup>b</sup> (%)
0,0	70	30
3,0	70	30
9,0	0	100
18,0	0	100
19,0	70	30
25,0	70	30

<sup>a</sup> Eluent A: 5 mM Ammoniumacetat-Puffer mit 0,5 % (v/v) Essigsäure

<sup>b</sup> Eluent B: Acetonitril/5 mM Ammoniumacetat/Essigsäure 99:1, 0,5 % (v/v)

**Tabelle 29:** Multi Reaction Monitoring MRM-Übergänge API 4000

Periode 1	Precursor	MRM 1 (m/z)	MRM 2 (m/z)	MRM 3 (m/z)
Ethopabat	$[M-H]^-$	236,09 $\rightarrow$ 191,80	236,09 $\rightarrow$ 133,30	-
Nicarbazin	$[M-H]^-$	301,06 $\rightarrow$ 136,80	301,06 $\rightarrow$ 106,90	-
Robenidin	$[M+H]^+$	333,99 $\rightarrow$ 138,00	333,99 $\rightarrow$ 155,00	333,99 $\rightarrow$ 111,00
DNC-d <sub>8</sub>	$[M-H]^-$	309,11 $\rightarrow$ 140,80	309,11 $\rightarrow$ 110,90	-
DNC- <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	$[M-H]^-$	313,13 $\rightarrow$ 142,90	313,13 $\rightarrow$ 113,00	-
Robenidin-d <sub>8</sub>	$[M+H]^+$	342,16 $\rightarrow$ 142,00	342,16 $\rightarrow$ 159,10	342,16 $\rightarrow$ 114,90
Periode 2	Precursor	MRM 1 (m/z)	MRM 2 (m/z)	MRM 3 (m/z)
Diclazuril	$[M-H]^-$	406,99 $\rightarrow$ 335,60	406,99 $\rightarrow$ 300,60	406,99 $\rightarrow$ 298,60
Diclazuril-bis	$[M-H]^-$	421,07 $\rightarrow$ 349,80	421,07 $\rightarrow$ 322,80	421,07 $\rightarrow$ 334,80
Periode 3	Precursor	MRM 1 (m/z)	MRM 2 (m/z)	MRM 3 (m/z)
Decoquinat	$[M+H]^+$	418,23 $\rightarrow$ 372,20	418,23 $\rightarrow$ 204,00	418,23 $\rightarrow$ 232,00
Semduramicin	$[M+NH_4]^+$	890,50 $\rightarrow$ 629,40	890,50 $\rightarrow$ 647,40	890,50 $\rightarrow$ 727,50
Lasalocid	$[M+NH_4]^+$	608,48 $\rightarrow$ 591,40	608,48 $\rightarrow$ 573,40	608,48 $\rightarrow$ 237,20
Salinomycin	$[M+NH_4]^+$	768,51 $\rightarrow$ 733,40	768,51 $\rightarrow$ 715,40	768,51 $\rightarrow$ 373,20
Narasin	$[M+NH_4]^+$	782,56 $\rightarrow$ 747,40	782,56 $\rightarrow$ 729,50	782,56 $\rightarrow$ 373,20
Monensin	$[M+NH_4]^+$	688,43 $\rightarrow$ 635,40	688,43 $\rightarrow$ 461,30	688,43 $\rightarrow$ 653,40
Maduramicin	$[M+NH_4]^+$	934,59 $\rightarrow$ 629,40	934,59 $\rightarrow$ 647,40	934,59 $\rightarrow$ 393,20
Decoquinat-d <sub>5</sub>	$[M+H]^+$	423,26 $\rightarrow$ 377,20	423,26 $\rightarrow$ 205,00	423,26 $\rightarrow$ 237,00
Nigericin	$[M+NH_4]^+$	742,53 $\rightarrow$ 657,40	742,53 $\rightarrow$ 675,50	742,53 $\rightarrow$ 461,30

**Tabelle 30:** Declustering Potential (DP), Entrance Potential (EP), Collision Cell Exit Potential (CXP) für die MRM-Übergänge (API 4000)

		DP(V)	CE (V)	CXP (V)	Dwelltime (ms)
Ethopabat	MRM 1	-77	-32	-9	50
	MRM 2	-77	-44	-9	20
Nicarbazin	MRM 1	-55	-20	-9	50
	MRM 2	-55	-52	-7	20
Robenidin	MRM 1	86	37	8	50
	MRM 2	86	31	10	20
	MRM 3	86	65	6	20
DNC-d <sub>8</sub>	MRM 1	-65	-20	-1	50
	MRM 2	-65	-52	-7	20
DNC- <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	MRM 1	-55	-20	-11	50
	MRM 2	-55	-52	-7	20

Fortsetzung Tabelle 30

		DP(V)	CE (V)	CXP (V)	Dwelltime (ms)
Robenidin-d <sub>8</sub>	MRM 1	96	37	26	50
	MRM 2	96	33	14	20
	MRM 3	96	67	4	20
Diclazuril	MRM 1	-75	-28	-7	250
	MRM 2	-75	-40	-5	150
	MRM 3	-75	-38	-5	100
Diclazuril-bis	MRM 1	-80	-28	-9	250
	MRM 2	-80	-34	-21	150
	MRM 3	-80	-36	-19	100
Decoquinat	MRM 1	76	35	10	70
	MRM 2	76	59	12	50
	MRM 3	76	49	18	20
Semduramicin	MRM 1	81	37	8	70
	MRM 2	81	29	10	50
	MRM 3	81	25	12	20
Lasalocid	MRM 1	76	17	14	70
	MRM 2	76	21	18	50
	MRM 3	76	33	4	20
Salinomycin	MRM 1	86	27	12	70
	MRM 2	86	37	22	50
	MRM 3	86	47	10	20
Narasin	MRM 1	86	29	12	70
	MRM 2	86	37	10	50
	MRM 3	86	47	8	20
Monensin	MRM 1	71	25	8	70
	MRM 2	71	35	14	50
	MRM 3	71	19	6	20
Maduramicin	MRM 1	91	37	18	70
	MRM 2	91	29	10	50
	MRM 3	91	41	10	20
Decoquinat-d <sub>5</sub>	MRM 1	86	35	10	70
	MRM 2	86	59	18	50
	MRM 3	86	51	16	20
Nigericin	MRM 1	86	39	20	70
	MRM 2	86	35	10	50
	MRM 3	86	43	14	20

**Tabelle 31:** Ionisations- und MS-Parameter der Kokzidiostatika-Multimethode (API 4000)

MS-Parameter	Einheit	Wert
Quelltemperatur	°C	450
Curtain Gas (CUR)	kPa	138,9
Ion Source Gas 1 (GS 1)	kPa	413,7
Ion Source Gas 2 (GS 2)	kPa	206,8
Collision Gas (CAD)	-	Medium
Ion transfer voltage (IS)	V	5000
Entrance Potential (EP)	V	10
Scan Type	-	MRM
Scan Mode	-	N/A
Ion Source	-	Turbo Spray
Resolution Q1	-	Unit
Resolution Q3	-	Unit
Intensity Threshold	cps	0
Settling Time	ms	700
MR Pause	ms	5
MCA	-	No
Step Size	amu	0,00

**LC-MS/MS-Multimethode für 11 Kokzidiostatika (TSQ Vantage)****Tabelle 32:** HPLC-Parameter Kokzidiostatika-Multimethode am TSQ Vantage

Injektionsvolumen	5 µl	
Nadelwaschprogramm	3 x Acetonitril, 3 x Acetonitril/H <sub>2</sub> O 3+7	
Temperatur Autosampler	Raumtemperatur (21 °C)	
Fluss	200 µl/min	
Temperatur Säulenofen	50 °C	
Zeit (min)	Eluent A <sup>a</sup> (%)	Eluent B <sup>b</sup> (%)
0,0	70	30
3,0	70	30
9,0	0	100
18,0	0	100
19,0	70	30
25,0	70	30

<sup>a</sup> Eluent A: 5 mM Ammoniumacetat-Puffer mit 0,5 % (v/v) Essigsäure<sup>b</sup> Eluent B: Acetonitril/5 mM Ammoniumacetat/Essigsäure 99:1, 0,5 % (v/v)

**Tabelle 33:** Selected Reaction Monitoring (SRM) – Übergänge (TSQ Vantage)

	Precursor	SRM 1 (m/z)	SRM 2 (m/z)	SRM 3 (m/z)
Ethopabat	$[M-H]^-$	235,93 $\rightarrow$ 192,16	235,93 $\rightarrow$ 162,13	-
Nicarbazin	$[M-H]^-$	300,92 $\rightarrow$ 137,13	300,92 $\rightarrow$ 107,11	-
Robenidin	$[M+H]^+$	333,99 $\rightarrow$ 111,12	333,99 $\rightarrow$ 195,09	333,99 $\rightarrow$ 113,12
DNC-d <sub>8</sub>	$[M-H]^-$	309,02 $\rightarrow$ 141,18	309,02 $\rightarrow$ 111,20	-
DNC- <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	$[M-H]^-$	313,00 $\rightarrow$ 143,18	313,00 $\rightarrow$ 113,22	-
Robenidin-d <sub>8</sub>	$[M+H]^+$	342,01 $\rightarrow$ 114,89	342,01 $\rightarrow$ 159,10	-
Diclazuril	$[M-H]^-$	406,88 $\rightarrow$ 336,08	406,88 $\rightarrow$ 300,89	406,88 $\rightarrow$ 308,2
Diclazuril-bis	$[M-H]^-$	421,11 $\rightarrow$ 107,22	421,11 $\rightarrow$ 143,20	-
Decoquinat	$[M+H]^+$	418,19 $\rightarrow$ 372,25	418,19 $\rightarrow$ 204,03	418,19 $\rightarrow$ 232,06
Semduramicin	$[M+NH_4]^+$	890,50 $\rightarrow$ 393,27	890,50 $\rightarrow$ 629,50	890,50 $\rightarrow$ 647,46
Lasalocid	$[M+NH_4]^+$	608,45 $\rightarrow$ 237,24	608,45 $\rightarrow$ 337,39	608,45 $\rightarrow$ 573,65
Salinomycin	$[M+NH_4]^+$	768,48 $\rightarrow$ 733,61	768,48 $\rightarrow$ 715,62	768,48 $\rightarrow$ 373,23
Narasin	$[M+NH_4]^+$	782,50 $\rightarrow$ 747,62	782,50 $\rightarrow$ 729,59	782,50 $\rightarrow$ 373,27
Monensin	$[M+NH_4]^+$	688,41 $\rightarrow$ 635,51	688,41 $\rightarrow$ 461,41	688,41 $\rightarrow$ 635,51
Maduramicin	$[M+NH_4]^+$	934,53 $\rightarrow$ 629,42	934,53 $\rightarrow$ 647,46	934,53 $\rightarrow$ 393,26
Decoquinat-d <sub>5</sub>	$[M+H]^+$	423,24 $\rightarrow$ 377,32	423,24 $\rightarrow$ 205,06	423,24 $\rightarrow$ 237,10
Nigericin	$[M+NH_4]^+$	742,47 $\rightarrow$ 657,58	742,47 $\rightarrow$ 675,58	742,47 $\rightarrow$ 461,42

**Tabelle 34:** S-Lens-Spannung, Collision Energy (CE), Dwelltime der Kokzidiostatika-Multimethode (TSQ Vantage)

		S-Lens (V)	CE (V)	Dwelltime (ms)
Ethopabat	SRM 1	60	24	50
	SRM 2	60	25	20
Nicarbazin	SRM 1	68	19	50
	SRM 2	68	42	20
Robenidin	SRM 1	114	42	50
	SRM 2	114	19	20
	SRM 3	114	43	20
DNC-d <sub>8</sub>	SRM 1	73	20	50
	SRM 2	73	40	20
DNC- <sup>13</sup> C <sub>12</sub>	SRM 1	73	18	50
	SRM 2	73	43	20
Robenidin-d <sub>8</sub>	SRM 1	114	42	50
	SRM 2	114	25	20



Fortsetzung Tabelle 34

		S-Lens (V)	CE (V)	Dwelltime (ms)
Diclazuril	SRM 1	124	22	50
	SRM 2	124	28	20
	SRM 3	124	31	20
Diclazuril-bis	SRM 1	124	42	50
	SRM 2	124	32	20
Decoquinat	SRM 1	121	22	50
	SRM 2	121	39	20
	SRM 3	121	34	20
Semduramicin	SRM 1	160	28	50
	SRM 2	160	25	20
	SRM 3	160	19	20
Lasalocid	SRM 1	116	22	50
	SRM 2	116	13	20
	SRM 3	116	11	20
Salinomycin	SRM 1	131	19	50
	SRM 2	131	24	20
	SRM 3	131	32	20
Narasin	SRM 1	133	19	50
	SRM 2	133	25	20
	SRM 3	133	26	20
Monensin	SRM 1	122	16	50
	SRM 2	122	24	20
	SRM 3	122	20	20
Maduramicin	SRM 1	162	24	50
	SRM 2	162	18	20
	SRM 3	162	27	20
Decoquinat-d <sub>5</sub>	SRM 1	131	24	50
	SRM 2	131	41	20
	SRM 3	131	35	20
Nigericin	SRM 1	158	27	50
	SRM 2	158	23	20
	SRM 3	158	28	20

**Tabelle 35:** Ionisation- und MS-Parameter der Kokzidiostatika-Multimethode (TSQ Vantage)

MS-Parameter	Einheit	Wert
Vaporizer Temperature	°C	400
Sheath Gas Pressure	kPa	275,8
Aux Gas Pressure	kPa	34,5
Ion Sweep Gas pressure	kPa	0
Capillary Temperature	°C	270
Collision Gas Pressure	Pa	0,2
Spray Voltage	V	4000
Entrance Potential (EP)	V	10
Q1 Peak Width	amu	0,7
Q3 Peak Width	amu	0,7
Intensity Threshold	cps	0
Settling Time	ms	20

**LC-MS/MS-Methode für Maduramicin (API 4000 QTrap)****Tabelle 36:** HPLC-Parameter der Maduramicin-Methode

Injektionsvolumen	5 µl	
Nadelwaschprogramm	3 x Acetonitril/H <sub>2</sub> O 9+1	
Temperatur Autosampler	Raumtemperatur (21 °C)	
Fluss	200 µl/min	
Temperatur Säulenofen	50 °C	
Zeit (min)	Eluent A <sup>a</sup> (%)	Eluent B <sup>b</sup> (%)
0,0	10	90
3,5	10	90
3,6	50	50
7,1	50	50
7,2	10	90
15,0	10	90

<sup>a</sup> Eluent A: 5 mM Ammoniumacetat-Puffer<sup>b</sup> Eluent B: Acetonitril/5 mM Ammoniumacetat 99+1 (v+v)

**Tabelle 37:** MRM-Übergänge der Maduramicin-Methode und zugehörige Einstellungen des De-clustering Potential (DP), Entrance Potential (EP) und Collision Cell Exit Potential (CXP)

Parameter		MRM 1	MRM 2	MRM 3
Maduramicin [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	m/z	934,59 → 629,40	934,59 → 647,40	934,59 → 393,20
	DP (V)	91	91	91
	CE (V)	37	29	41
	CXP (V)	18	10	10
	Dwelltime (ms)	200	50	50
Nigericin [M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	m/z	742,53 → 657,40	742,53 → 675,50	742,53 → 461,30
	DP (V)	86	86	86
	CE (V)	39	35	43
	CXP (V)	20	10	14
	Dwelltime (ms)	200	50	50

**Tabelle 38:** Ionisations- und MS-Parameter der Maduramicin-Methode

MS-Parameter	Einheit	Wert
Quelltemperatur	°C	450
Curtain Gas (CUR)	kPa	137,9
Ion Source Gas 1 (GS 1)	kPa	413,9
Ion Source Gas 2 (GS 2)	kPa	206,8
Collision Gas (CAD)	-	Medium
Ion transfer voltage (IS)	V	5000
Entrance Potential (EP)	V	10
Scan Type	-	MRM
Scan Mode	-	N/A
Ion Source	-	Turbo Spray
Resolution Q1	-	Unit
Resolution Q3	-	Unit
Intensity Threshold	cps	0
Settling Time	ms	700
MR Pause	ms	5
MCA	-	No
Step Size	amu	0,00

**LC-MS/MS-Methode für CBX und OQX****Tabelle 39:** Zusammensetzung des Gradienten für die Ascentis Express C18-Säule

Zeit (min)	10 mM Ammoniumformiat(%)	Methanol (%)
0,0	50	50
2,0	50	50
6,0	10	90
10,0	10	90
12,0	50	50
18,0	50	50

**Tabelle 40:** Zusammensetzung des Gradienten für die Luna Aqua C18-Säule

Zeit (min)	10 mM Ammoniumformiat(%)	Methanol (%)
0,0	90	10
2,0	90	10
6,0	50	50
10,0	50	50
12,0	90	10
18,0	90	10

**Tabelle 41:** Zusammensetzung des Gradienten für die HILIC-Säule

Zeit (min)	10 mM Ammoniumformiat (%)	Acetonitril (%)
0,0	10	90
2,0	10	90
6,0	50	50
10,0	50	50
12,0	10	90
18,0	10	90

**Tabelle 42:** MRM-Übergänge und zugehörige Parameter Declustering Potential (DP), Entrance Potential (EP), Collision Cell Exit Potential (CXP) und Dwelltime für CBX und OQX

	Parameter	MRM 1	MRM 2	MRM 3
	m/z	263,2 → 231,0	263,2 → 129,0	263,2 → 103,0
CBX [M+H] <sup>+</sup>	DP (V)	66	66	66
	CE (V)	19	45	47
	CXP (V)	14	6	6
	Dwelltime (ms)	100	50	50
	m/z	264,2 → 143,1	264,2 → 221,0	264,2 → 212,1
OQX [M+H] <sup>+</sup>	DP (V)	61	61	61
	CE (V)	45	21	31
	CXP (V)	8	14	12
	Dwelltime (ms)	100	50	50

**Tabelle 43:** Ionisations- und MS-Parameter für CBX und OQX

MS-Parameter	Einheit	Wert
Quelltemperatur	°C	650
Curtain Gas (CUR)	kPa	137,9
Ion Source Gas 1 (GS 1)	kPa	206,8
Ion Source Gas 2 (GS 2)	kPa	379,2
Collision Gas (CAD)	-	Medium
Ion transfer voltage (IS)	V	4500
Entrance Potential (EP)	V	10
Scan Type	-	MRM
Scan Mode	-	N/A
Ion Source	-	Turbo Spray
Resolution Q1	-	Unit
Resolution Q3	-	Unit
Intensity Threshold	cps	0
Settling Time	ms	700
MR Pause	ms	5
MCA	-	No
Step Size	amu	0,00



---

## Literatur

- [1] VERORDNUNG (EG) Nr. 1831/2003 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung. *Amtsblatt der Europäischen Union* 2003, 46, 29–43.
- [2] VERORDNUNG (EG) Nr. 882/2004 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 29. April 2004 über amtliche Kontrollen zur Überprüfung der Einhaltung des Lebensmittel- und Futtermittelrechts sowie der Bestimmungen über Tiergesundheit und Tierschutz. *Amtsblatt der Europäischen Union* 2004, 47, 1–141.
- [3] Le Bizec, B., Pinel, G., Antignac, J.P., Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216, 8016–8034.
- [4] Songsermsakul, P., Razzazi-Fazeli, E., A review of recent trends in applications of liquid chromatography-mass spectrometry for determination of mycotoxins. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 2008, 31, 1641–1686.
- [5] Bogialli, S., Di Corcia, A., Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2009, 395, 947–966.
- [6] Vincent, U., Ezerskis, Z., Chedin, M., Von Holst, C., Determination of ionophore coccidiostats in feeding stuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Part II. Application to cross-contamination levels and non-targeted feed. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2010, 54, 526–534.
- [7] RICHTLINIE 2009/8/EG DER KOMMISSION vom 10. Februar 2009 zur Änderung von Anhang I der Richtlinie 2002/32/EG des Europäischen Parlaments und des Rates hinsichtlich Höchstgehalten an Kokzidiostatika und Histomonostatika, die aufgrund unvermeidbarer Versch. *Amtsblatt der Europäischen Union* 2009, 52, 19–25.
- [8] VERORDNUNG (EG) Nr. 124/2009 DER KOMMISSION vom 10. Februar 2009 zur Festlegung von Höchstgehalten an Kokzidiostatika und Histomonostatika, die in Lebensmitteln aufgrund unvermeidbarer Verschleppung in Futtermittel für Nichtziel-tierarten vorhanden sind. *Amtsblatt der Europäischen Union* 2009, 52, 7–11.
- [9] Dolenc J. Ganik K.S., C.R., Accumulation of Maduramicin in Eggs. *Sixth International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis, Ghent University - Proceedings* 2009, Poster-Beitrag.
- [10] RICHTLINIE DES RATES vom 23. November 1970 über Zusatzstoffe in der Tierernährung (70/524/EWG). *Amtsblatt der Europäischen Union* 1970, 13, 1–39.
- [11] Pressman, B.C., Fahim, M., Pharmacology and Toxicology of the Mono-Valent Carboxylic Ionophores. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 1982, 22, 465–490.

- [12] Budavari, S., O'Neil, M., Smith, A., Heckelman, P., Obenchain, J., *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*, Merck Research Laboratories Division of Merck Inc., New Jersey 1996.
- [13] Fry, M., Williams, R.B., Effects of Decoquinate and Clopidol on Electron-Transport in Mitochondria of *Eimeria-Tenella* (Apicomplexa, Coccidia). *Biochemical Pharmacology* 1984, 33, 229–240.
- [14] Matabudul, D.K., Lumley, I.D., Points, J.S., The determination of 5 anticoccidial drugs (nicarbazin, lasalocid, monensin, salinomycin and narasin) in animal livers and eggs by liquid chromatography linked with tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Analyst* 2002, 127, 760–768.
- [15] Long, P.L., Jeffers, T.K., Studies on the Stage of Action of Ionophorous Antibiotics against *Eimeria*. *The Journal of Parasitology* 1982, 68, 363–371.
- [16] Chapman, H.D., Resistance to Anticoccidial Drugs in Fowl. *Parasitology Today* 1993, 9, 159–162.
- [17] Cross-contamination of non-target feedingstuffs by lasalocid authorised for use as a feed additive - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal* 2007, 553, 1–46.
- [18] Cross-contamination of non-target feedingstuffs by narasin authorised for use as a feed additive - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal* 2007, 552, 1–35.
- [19] Cross-contamination of non-target feedingstuffs by salinomycin authorised for use as a feed additive - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal* 2008, 591, 1–38.
- [20] Cross-contamination of non-target feedingstuffs by monensin authorised for use as a feed additive - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal* 2008, 592, 1–40.
- [21] Kreuzkontamination von nicht zieltierartenspezifischen Futtermitteln durch als Futtermittelzusatzstoff zugelassenes Semduramicin - Wissenschaftliches Gutachten des Gremiums für Kontaminanten in der Lebensmittelkette. *The EFSA Journal* 2008, 6, 1–2.
- [22] Cross-contamination of non-target feedingstuffs by maduramicin authorised for use as a feed additive - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal* 2008, 594, 1–30.
- [23] Cross-contamination of non-target feedingstuffs by robenidine authorised for use as a feed additive - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal* 2008, 655, 1–29.



- 
- [24] Cross-contamination of non-target feedingstuffs by decoquinate authorised for use as a feed additive - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal* 2008, 656, 1–26.
- [25] Halofuginone: Summary report (2) - The European Medicines Agency, Committee for Veterinary Medicinal Products. *EMEA/MRL/7* 2000, 1–7.
- [26] Cross-contamination of non-target feedingstuffs by halofuginone authorised for use as a feed additive - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal* 2008, 657, 1–31.
- [27] Cross-contamination of non-target feedingstuffs by nicarbazin authorised for use as a feed additive - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal* 2008, 690, 1–34.
- [28] Cross-contamination of non-target feedingstuffs by diclazuril authorised for use as a feed additive - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal* 2008, 716, 1–31.
- [29] Pressman, B.C., Fahim, M., Cardiovascular Toxicity of Ionophores Used As Feed Additives. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1983, 161, 543–561.
- [30] Weppelman, R.M., Olson, G., Smith, D.A., Tamas, T., Van Iderstine, A., Comparison of Anticoccidial Efficacy, Resistance and Tolerance of Narasin, Monensin and Lasalocid in Chicken Battery Trials. *Poultry Science* 1977, 56, 1550–1559.
- [31] Jeffers, T.K., Challey, J.R., Collateral sensitivity to 4-hydroxyquinolines in *Eimeria acervulina* strains resistant to meticlorpindol. *The Journal of Parasitology* 1973, 59, 624–630.
- [32] Sangster, N. C., Managing parasiticide resistance. *Veterinary Parasitology* 2001, 98, 89–109.
- [33] Kreuzkontamination von nicht zieltierartenspezifischen Futtermitteln durch als Futterzusatzstoff zugelassenes Robenidin, Zusammenfassung des Wissenschaftliches Gutachtens des Gremiums für Kontaminanten in der Lebensmittelkette. *The EFSA Journal* 2008, 655, 1–2.
- [34] RICHTLINIE 2002/32/EG DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 7. Mai 2002 über unerwünschte Stoffe in der Tierernährung. *Amtsblatt der Europäischen Union* 2002, 45, 10–21.
- [35] VERORDNUNG (EWG) Nr. 2377/90 DES RATES vom 26. Juni 1990 zur Schaffung eines Gemeinschaftsverfahrens für die Festsetzung von Höchstmengen für Tierarzneimittelrückstände in Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs. *Amtsblatt der Europäischen Union* 1990, 33, 1–8.
-

- [36] VERORDNUNG (EWG) Nr. 315/93 DES RATES vom 8. Februar 1993 zur Festlegung von gemeinschaftlichen Verfahren zur Kontrolle von Kontaminanten in Lebensmitteln. *Amtsblatt der Europäischen Union* 1993, 36, 1–5.
- [37] Kennedy, D.G., Hughes, P.J., Blanchflower, W.J., Ionophore residues in eggs in Northern Ireland: incidence and cause. *Food Additives and Contaminants* 1998, 15, 535–541.
- [38] Kennedy, D.G., Blanchflower, W.J., Hughes, P.J., McCaughey, W.J., The incidence and cause of lasalocid residues in eggs in Northern Ireland. *Food Additives and Contaminants* 1996, 13, 787–794.
- [39] Kennedy, D.G., Smyth, W.G., Hewitt, S.A., McEvoy, J.D.G., Monensin carry-over into unmedicated broiler feeds. *Analyst* 1998, 123, 2529–2533.
- [40] BVL - Nationaler Rückstandskontrollplan (NRKP) und Einfuhrückstandskontrollplan (ERKP) für Lebensmittel tierischen Ursprungs, [http://www.bvl.bund.de/DE/01\\_Lebensmittel/01\\_Aufgaben/02\\_AmtlicheLebensmittelueberwachung/07\\_NRKP/lm\\_nrkp\\_node.htm](http://www.bvl.bund.de/DE/01_Lebensmittel/01_Aufgaben/02_AmtlicheLebensmittelueberwachung/07_NRKP/lm_nrkp_node.htm), 2013.
- [41] Taylor, P., Kennedy, D.G., Hughes, P.J., Ionophore residues in eggs in Northern Ireland: incidence and cause. *Food Additives and Contaminants* 1998, 15, 535–541.
- [42] Weiss, G., Macdonald, A., Methods for the Determination of Ionophore Type Antibiotic Residues in Animal Tissues. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1985, 68, 971–980.
- [43] Weiss, G., Kaykaty, M., Miwa, B., A Pyrolysis-Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Confirmatory Method for Lasalocid Sodium in Bovine Liver. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1983, 31, 78–81.
- [44] Takatsuki, K., Suzuki, S., Ushizawa, I., Liquid chromatographic determination of monensin in chicken tissues with fluorometric detection and confirmation by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1986, 69, 443–8.
- [45] Elliott, C.T., Kennedy, D.G., McCaughey, W.J., Methods for the detection of polyether ionophore residues in poultry. *Analyst* 1998, 123, 45R–56R.
- [46] Kot-Wasik, A., Wasik, A., Determination of robenidine in animal feeds by liquid chromatography coupled with diode-array detection and mass spectrometry after accelerated solvent extraction. *Analytica Chimica Acta* 2005, 543, 46–51.
- [47] Dowling, G., O’Keeffe, M., Smyth, M.R., Determination of robenidine in eggs by liquid chromatography with UV spectrophotometric detection. *Analytica Chimica Acta* 2005, 539, 31–34.

- [48] Matabudul, D.K., Crosby, N.T., Sumar, S., A new and rapid method for the determination of nicarbazin residues in poultry feed, eggs and muscle tissue using supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatography. *Analyst* 1999, 124, 499–502.
- [49] Tarbin, J.A., Shearer, G., High-Performance Liquid-Chromatographic Method for the Determination of the Dinitrocarbanilide Component of Nicarbazin in Eggs with Online Cleanup. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* 1993, 613, 354–358.
- [50] Krabel, B.J., Dickson, D.A., Zimmermann, A.G., Coleman, M.R., Liquid chromatographic determination of nicarbazin in feeds. *Journal of AOAC International* 1994, 83, 1027–1038.
- [51] Dekock, J., Desmet, M., Sneyers, R., Determination of Diclazuril in Animal Feed by Liquid-Chromatography. *Journal of Chromatography* 1992, 606, 141–146.
- [52] Crosby, N.T., Anderson, A., Argent, A.J., Ashby, C.W., et al., Determination of Lasalocid Sodium in Poultry Feeds and Premixes. *Analyst* 1995, 120, 2175–2180.
- [53] Weiss, G., Felicito, N.R., Kaykaty, M., Chen, G., et al., Tissue Residue Regulatory Method for the Determination of Lasalocid Sodium in Cattle Liver Using High-Performance Liquid-Chromatography with Fluorometric Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1983, 31, 75–78.
- [54] Dusi, G., Gamba, V., Liquid chromatography with ultraviolet detection of lasalocid, monensin, salinomycin and narasin in poultry feeds using pre-column derivatization. *Journal of Chromatography A* 1999, 835, 243–246.
- [55] Asukabe, H., Murata, H., Harada, K., Suzuki, M., et al., Improvement of chemical analysis of antibiotics. 21. Simultaneous determination of three polyether antibiotics in feeds using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1994, 42, 112–117.
- [56] Gliddon, M.J., Wright, D., Markantonatos, A., Groth, W., Determination of Maduramicin Ammonium in Poultry Feedstuffs by High-Performance Liquid-Chromatography. *Analyst* 1998, 113, 813–816.
- [57] Martinez, E.E., Shimoda, W., Determination of monensin sodium residues in beef liver tissue by liquid chromatography of a fluorescent derivative. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1985, 68, 1149–53.
- [58] Martinez, E.E., Shimoda, W., Liquid chromatographic determination of multiresidue fluorescent derivatives of ionophore compounds, monensin, salinomycin, narasin, and lasalocid, in beef liver tissue. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1986, 69, 637–41.

- [59] Miyakawa, H., Horii, S., Kokubo, Y., Simultaneous Determination of Salinomycin and Monensin in Chicken Meat by HPLC. *Food Hygiene and Safety Science* 1995, 36, 725.
- [60] Dimenna, G.P., Creegan, J.A., Turnbull, L.B., Wright, G.J., Determination of sodium salinomycin in chicken skin/fat by high-performance liquid chromatography utilizing column switching and UV detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1986, 34, 805–810.
- [61] Akhtar, M.H., ElSooud, A., Shehata, M.A.A., Concentrations of salinomycin in eggs and tissues of laying chickens fed medicated feed for 14 days followed by withdrawal for 3 days. *Food Additives and Contaminants* 1996, 13, 897–907.
- [62] Muldoon, M.T., Elissalde, M.H., Beier, R.C., Stanker, L.H., Development and Validation of a Monoclonal Antibody-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Salinomycin in Chicken Liver Tissue. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1995, 43, 1745–1750.
- [63] Moran, J.W., Rodewald, J.M., Donoho, A.L., Coleman, M.R., Determination of monensin in chicken tissues by liquid chromatography with postcolumn derivatization. *Journal of AOAC International* 1994, 77, 885–890.
- [64] Ericson, J.F., Calcagni, A., Lynch, M.J., Determination of semduramicin sodium in poultry liver by liquid chromatography with vanillin postcolumn derivatization. *Journal of AOAC International* 1994, 77, 577–582.
- [65] Gerhardt, G., Salisbury, C.D., Campbell, H.M., Determination of ionophores in the tissues of food animals by liquid chromatography. *Food additives and contaminants* 1995, 12, 731–737.
- [66] Muldoon Mark T., Elissalde Marcel H., Beier Ross C., Stanker Larry H., Immunoassays for Residue Analysis, vol. 621, *American Chemical Society*, Washington, DC 1996.
- [67] Huet, A.C., Mortier, L., Daeseleire, E., Fodey, T., et al., Screening for the coccidiostats halofuginone and nicarbazin in egg and chicken muscle: development of an ELISA. *Food Additives and Contaminants* 2005, 22, 128–134.
- [68] Peippo, P., Lovgren, T., Tuomola, M., Rapid screening of narasin residues in poultry plasma by time-resolved fluoroimmunoassay. *Analytica Chimica Acta* 2005, 529, 27–31.
- [69] Hagren, V., Connolly, L., Elliott, C.T., Lovgren, T., Tuomola, M., Rapid screening method for halofuginone residues in poultry eggs and liver using time-resolved fluorometry combined with the all-in-one dry chemistry assay concept. *Analytica Chimica Acta* 2005, 529, 21–25.

- 
- [70] Hiroo Watanabe, A.S.Y.K.A.T., Development of Monoclonal-based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Immunochromatographic Assay for Lasalocid and Semduramicin. *SHOKUEISHI* 2004, 45, 107–112.
- [71] Beier, R.C., Dutko, T.J., Buckley, S.A., Muldoon, M.T., et al., Detection of halofuginone residues in chicken liver tissue by HPLC and a monoclonal-based immunoassay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998, 46, 1049–1054.
- [72] Horii, S., Miyahara, K., Maruyama, T., Confirmation of residual lasalocid sodium in commercial chicken liver by thermospray liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Food Hygienics Society of Japan* 1991, 32, 30–37.
- [73] Stout, S.J., Wilson, L.A., Kleiner, A.I., Dacunha, A.R., Franc, T.J., Mass-Spectrometric Approaches to the Confirmation of Maduramicin-Alpha in Chicken Fat. *Biomedical and Environmental Mass Spectrometry* 1989, 18, 57–63.
- [74] Blomkvist, G.B., Jansson, K.M., Ryhage, E.R., Osterdahl, B.G., Qualitative and Quantitative-Analysis of Monensin A Sodium-Salt in the Low-Nanogram Range by Thin-Layer Chromatography and Fast-Atom-Bombardment Mass-Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1986, 34, 274–276.
- [75] Schneider, R.P., Lynch, M.J., Ericson, J.F., Fouda, H.G., Electrospray Ionization Mass-Spectrometry of Semduramicin and Other Polyether Ionophores. *Analytical Chemistry* 1991, 63, 1789–1794.
- [76] Blanchflower, W.J., Kennedy, D.G., Determination of Lasalocid in Eggs Using Liquid Chromatography-Electrospray Mass-Spectrometry. *Analyst* 1995, 120, 1129–1132.
- [77] BLANCHFLOWER, W., KENNEDY, D., Determination of monensin, salinomycin and narasin in muscle, liver and eggs from domestic fowl using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1996, 675, 225–233.
- [78] Dubois, M., Pierret, G., Delahaut, P., Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats in egg and muscle by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2004, 813, 181–189.
- [79] Olejnik, M., Szprengier-Juszkiewicz, T., Jedziniak, P., Multi-residue confirmatory method for the determination of twelve coccidiostats in chicken liver using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216, 8141–8148.
- [80] Martinez-Villalba, A., Moyano, E., Galceran, M.T., Fast liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry of coccidiostats. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2009, 23, 1255–1263.
-

- [81] Shao, B., Wu, X.Y., Zhang, J., Duan, H.J., et al., Development of a Rapid LC-MS-MS Method for Multi-Class Determination of 14 Coccidiostat Residues in Eggs and Chicken. *Chromatographia* 2009, 69, 1083–1088.
- [82] Delahaut, P., Pierret, G., Ralet, N., Dubois, M., Gillard, N., Multi-residue method for detecting coccidiostats at carry-over level in feed by HPLC-MS/MS. *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 2010, 27, 801–809.
- [83] Dubreil-Cheneau, E., Bessiral, M., Roudaut, B., Verdon, E., Sanders, P., Validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for 10 anticoccidials in eggs according to Commission Decision 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216, 8149–8157.
- [84] Mortier, L., Daeseleire, E., Van Peteghem, C., Determination of the ionophoric coccidiostats narasin, monensin, lasalocid and salinomycin in eggs by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2005, 19, 533–539.
- [85] Mortier, L., Daeseleire, E., Van Peteghem, C., Liquid chromatographic tandem mass spectrometric determination of five coccidiostats in poultry eggs and feed. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2005, 820, 261–270.
- [86] Turnipseed, S.B., Roybal, J.E., Pfenning, A.P., Gonzales, S.A., et al., LC/MS confirmation of ionophores in animal feeds. *Journal of AOAC International* 2001, 84, 640–647.
- [87] Yakkundi, S., Cannavan, A., Elliott, C.T., Lovgren, T., Kennedy, D.G., Development and validation of a method for the confirmation of nicarbazin in chicken liver and eggs using LC-electrospray MS-MS according to the revised EU criteria for veterinary drug residue analysis. *Analyst* 2001, 126, 1985–1989.
- [88] Rokka, M., Peltonen, K., Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: Validation of an LC-MS/MS method. *Food Additives and Contaminants* 2006, 23, 470–478.
- [89] Matabudul, D.K., Conway, B., Lumley, I., Sumar, S., The simultaneous determination of the ionophore antibiotics in animal tissues and eggs by tandem electrospray LC-MS-MS. *Food Chemistry* 2001, 75, 345–354.
- [90] Thompson, M., Ellison, S.L.R., A review of interference effects and their correction in chemical analysis with special reference to uncertainty. *Accreditation and Quality Assurance* 2005, 10, 82–97.
- [91] Rainier, R.H., Harris, D.L., Glock, R.D., Kinyon, J.M., Brauer, M.A., Carbadox and Lincomycin in the Treatment and Carrier State Control of Swine-Dysentery. *American Journal of Veterinary Research* 1980, 41, 1349–1356.

- 
- [92] Vanburen, J.W., Comparison of Lincomycin and Carbadox for Treatment and Control of Swine-Dysentery. *Modern Veterinary Practice* 1981, 62, 142–144.
- [93] Yen, J.T., Nienaber, J.A., Pond, W.G., Varel, V.H., Effect of carbadox on growth, fasting metabolism, thyroid function and gastrointestinal tract in young pigs. *The Journal of Nutrition* 1985, 115, 970–9.
- [94] Laine, T., Yliaho, M., Myllys, V., Pohjanvirta, T., et al., The effect of antimicrobial growth promoter withdrawal on the health of weaned pigs in Finland. *Preventive veterinary medicine* 2004, 66, 163–74.
- [95] Commission Regulation (EC) No 2788/98 of 22 December 1998 amending Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs as regards the withdrawal of authorisation for certain growth promoters. *Official Journal of the European Communities* 1998, L347, 31–32.
- [96] WHO, Evaluation of certain veterinary drug residues in food (Thirty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). *WHO Technical Report Series* 1990, No. 799.
- [97] WHO, Evaluation of certain veterinary drug residues in food (Forty-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). *WHO Technical Report Series* 1995, No. 851.
- [98] Kesiunaite, G., Padarauskas, A., Development of high-performance liquid chromatography for the determination of carbadox and olaquinox in animal feed. *Chemija* 2007, 18, 30–34.
- [99] Hutchinson, M.J., Young, P.B., Kennedy, D.G., Confirmatory method for the analysis of carbadox and olaquinox in porcine feedingstuffs using LC-electrospray MS-MS. *Food Additives and Contaminants* 2005, 22, 113–119.
- [100] Van Poucke, C., De Keyser, K., Baltusnikiene, A., McEvoy, J.D., Van Peteghem, C., Liquid chromatographic–tandem mass spectrometric detection of banned antibacterial growth promoters in animal feed. *Analytica Chimica Acta* 2003, 483, 99–109.
- [101] Situ, C., Grutters, E., Van Wichen, P., Elliott, C.T., A collaborative trial to evaluate the performance of a multi-antibiotic enzyme-linked immunosorbent assay for screening five banned antimicrobial growth promoters in animal feedingstuffs. *Analytica Chimica Acta* 2006, 561, 62–68.
- [102] Wu, Y.J., Wang, Y.L., Huang, L., Tao, Y.F., et al., Simultaneous determination of five quinoxaline-1,4-dioxides in animal feeds using ultrasonic solvent extraction and high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 2006, 569, 97–102.
- [103] Gizzi, G., Vincent, U., Von Holst, C., De Jong, J., Genouel, C., Validation of an analytical method for the determination of carbadox and olaquinox in feedstuff by liquid chromatography coupled to UV and/or diode array detection. *Food Additives and Contaminants* 2007, 24, 1226–1235.
-

- [104] Nagata, T., Saeki, M., Simultaneous Determination of Five Antibacterials in Swine Muscle by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography* 1991, 14, 2551–2561.
- [105] Fuh, M.R.S., Chan, S.A., Wang, H.L., Lin, C.Y., Determination of antibacterial reagents by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. *Talanta* 2000, 52, 141–151.
- [106] Aerts, M.M., Beek, W.M., Keukens, H.J., Brinkman, U.A., Determination of residues of carbadox and some of its metabolites in swine tissues by high-performance liquid chromatography using on-line pre-column enrichment and post-column derivatization with UV-VIS detection. *Journal of Chromatography* 1988, 456, 105–19.
- [107] Bories, G.F., High-performance liquid chromatographic determination of Olaquinox in feeds. *Journal of Chromatography* 1979, 172, 505–8.
- [108] Song, W.L., Huang, M., Rumbeiha, W., Li, H., Determination of amprolium, carbadox, monensin, and tylosin in surface water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2007, 21, 1944–1950.
- [109] Van Poucke, C., Dumoulin, F., Van Peteghem, C., Detection of banned antibacterial growth promoters in animal feed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry: optimisation of the extraction solvent by experimental design. *Analytica Chimica Acta* 2005, 529, 211–220.
- [110] Wu, C.M., Li, Y., Shen, J.Z., Cheng, L.L., et al., LC-MS-MS Quantification of Four Quinoxaline-1,4-Dioxides in Swine Feed. *Chromatographia* 2009, 70, 1605–1611.
- [111] Kebarle, P., Tang, L., From Ions in Solution to Ions in the Gas-Phase - the Mechanism of Electrospray Mass-Spectrometry. *Analytical Chemistry* 1993, 65, A972–A986.
- [112] Bruins, A.P., Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A* 1998, 794, 345–357.
- [113] Hager, J.W., Le Blanc, J.C.Y., High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with a new quadrupole/linear ion trap instrument. *Journal of Chromatography A* 2003, 1020, 3–9.
- [114] Williams, J.D., Burinsky, D.J., Mass spectrometric analysis of complex mixtures then and now: the impact of linking liquid chromatography and mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* 2001, 212, 111–133.
- [115] Reemtsma, T., Liquid chromatography–mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants. *Journal of Chromatography A* 2003, 1000, 477–501.
- [116] Wu, J.-T., Zeng, H., Qian, M., Brogdon, B.L., Unger, S.E., Direct Plasma Sample Injection in Multiple-Component LC-MS-MS Assays for High-Throughput Pharmacokinetic Screening. *Analytical Chemistry* 2000, 72, 61–67.



- [117] Hopfgartner, G., Bourgonne, E., Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews* 2003, 22, 195–214.
- [118] Buhrman, D.L., Price, P.I., Rudewicz, P.J., Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography tandem mass spectrometry: A study of ion suppression. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 1996, 7, 1099–1105.
- [119] Bonfiglio, R., King, R.C., Olah, T. V, Merkle, K., The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 1999, 13, 1175–1185.
- [120] Choi, B.K., Hercules, D.M., Gusev, A.I., Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography–tandem mass spectrometry signal suppression. *Journal of Chromatography A* 2001, 907, 337–342.
- [121] Tang, L., Kebarle, P., Dependence of Ion Intensity in Electrospray Mass-Spectrometry on the Concentration of the Analytes in the Electrosprayed Solution. *Analytical Chemistry* 1993, 65, 3654–3668.
- [122] Eshraghi, J., Chowdhury, S.K., Factors affecting electrospray ionization of effluents containing trifluoroacetic acid for high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 1993, 65, 3528–3533.
- [123] Antignac, J.P., De Wasch, K., Monteau, F., De Brabander, H., et al., The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue. *Analytica Chimica Acta* 2005, 529, 129–136.
- [124] Souverain, S., Rudaz, S., Veuthey, J.L., Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. *Journal of Chromatography A* 2004, 1058, 61–66.
- [125] Ismaiel, O.A., Halquist, M.S., Elmamly, M.Y., Shalaby, A., Karnes, H.T., Monitoring phospholipids for assessment of matrix effects in a liquid chromatography-tandem hydrocodone mass spectrometry method for and pseudoephedrine in human plasma. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2007, 859, 84–93.
- [126] Mei, H., Hsieh, Y., Nardo, C., Xu, X., et al., Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery. *Rapid communications in mass spectrometry* 2003, 17, 97–103.
- [127] Ghosh, C., Shinde, C.P., Chakraborty, B.S., Influence of ionization source design on matrix effects during LC-ESI-MS/MS analysis. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2012, 893, 193–200.

- [128] Stahnke, H., Kittlaus, S., Kempe, G., Hemmerling, C., Alder, L., The influence of electrospray ion source design on matrix effects. *Journal of Mass spectrometry* 2012, 47, 875–84.
- [129] Lindegardh, N., Annerberg, A., White, N.J., Day, N.P.J., Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for determination of piperazine in plasma table isotope labeled internal standard does not always compensate for matrix effects. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2008, 862, 227–236.
- [130] Annesley, T.M., Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 2003, 49, 1041–1044.
- [131] Trufelli, H., Palma, P., Famiglini, G., Cappiello, A., An Overview of Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 2011, 30, 491–509.
- [132] Donoghue, D.J., Myers, K., Imaging residue transfer into egg yolks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, 48, 6428–6430.
- [133] Kallweit, E., Kielwein, G., Fries, R., Scholtyssek, S., *Qualität tierischer Nahrungsmittel: Fleisch, Milch, Eier*, Verlag Ulmer, Stuttgart 2007.
- [134] Yakkundi, S., Cannavan, A., Young, P.B., Elhott, C.T., Kennedy, D.G., Halofuginone contamination in feeds as a cause of residues in eggs. *Analytica Chimica Acta* 2002, 473, 177–182.
- [135] Cannavan, A., Ball, G., Kennedy, D.G., Nicarbazine contamination in feeds as a cause of residues in eggs. *Food Additives and Contaminants* 2000, 17, 829–836.
- [136] Rokka, M., Eerola, S., Perttilä, U., Rossow, L., et al., The residue levels of narasin in eggs of laying hens fed with unmedicated and medicated feed. *Molecular Nutrition & Food Research* 2005, 49, 38–42.
- [137] Schwedt, G., *Analytische Chemie: Grundlagen, Methoden und Praxis*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2008.
- [138] Phenomenex, Strata X Polymeric Reversed Phase. Homepage Produktbeschreibung 2013, <http://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata-X>.
- [139] Waters, Waters Oasis SPE. Homepage Produktbeschreibung 2012, [http://www.waters.com/waters/de\\_DE/Oasis-Sample-Extraction-Products/nav.htm?cid=513209&locale=de\\_DE](http://www.waters.com/waters/de_DE/Oasis-Sample-Extraction-Products/nav.htm?cid=513209&locale=de_DE)
- [140] SUPELCO, HybridSPE-Phospholipid Technology. Homepage Produktbeschreibung 2012, [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General\\_Information/1/t409095.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General_Information/1/t409095.pdf).

- 
- [141] Stahnke, H., Reemtsma, T., Alder, L., Compensation of Matrix Effects by Post-column Infusion of a Monitor Substance in Multiresidue Analysis with LC-MS/MS. *Analytical Chemistry* 2009, 81, 2185–2192.
- [142] DIN 38402-51:1986-05 Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser u. Schlammuntersuchung; Allgemeine Angaben; Kalibrierung von Analysenverfahren, Auswertung von Analysenergebnissen u. lineare Kalibrierfunktionen für die Bestimmung von Verfahrenskenngr. Beuth Verlag GmbH 1986.
- [143] DIN 32645:2008-11 Chemische Analytik - Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen - Begriffe, Verfahren, Auswertung. Beuth Verlag GmbH 2008.
- [144] Funk, W., Dammann, V., Donnevert, G., *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim 2005.
- [145] Tierschutzgesetz. *Bundesgesetzblatt* 1972, 1, 1278–1283.
- [146] Van der Veen, A.M.H., Nater, D.A.G., Sample preparation from bulk samples: an overview. *Fuel Processing Technology* 1993, 36, 1–7.
- [147] Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R., The International Harmonized Protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry* 2006, 78, 145–196.
- [148] Mallet, C.R., Lu, Z.L., Mazzeo, J.R., A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2004, 18, 49–58.
- [149] Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., Chavez-Eng, C.M., Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: A method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. *Analytical Chemistry* 1998, 70, 882–889.
- [150] Li, B.Z., Lei, Z.P., Zhang, X.H., Huang, Z.G., Adsorption of simple aromatics from aqueous solutions on modified activated carbon fibers. *Catalysis Today* 2010, 158, 515–520.
- [151] Stokvis, E., Rosing, H., Beijnen, J.H., Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not? *Rapid communications in mass spectrometry* 2005, 19, 401–7.
- [152] Wang, S., Cyronak, M., Yang, E., Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007, 43, 701–707.
-

- [153] Van Eeckhaut, A., Lanckmans, K., Sarre, S., Smolders, I., Michotte, Y., Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2009, 877, 2198–207.
- [154] Karas, M., Bahr, U., Dülcks, T., Nano-electrospray ionization mass spectrometry: addressing analytical problems beyond routine. *Journal of Analytical Chemistry* 2000, 366, 669–676.
- [155] Alder, L., Lüderitz, S., Lindtner, K., Stan, H.-J., The ECHO technique—the more effective way of data evaluation in liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Journal of chromatography A* 2004, 1058, 67–79.
- [156] DIN EN 15781:2009-11, Futtermittel - Bestimmung von Maduramicin-Ammonium durch Umkehrphasen HPLC-Verfahren mittels Nachsäulenderivatisierung 2009.
- [157] MacLachlan, D.J., Estimating the transfer of contaminants in animal feedstuffs to livestock tissues, milk and eggs: a review. *Animal Production Science* 2011, 51, 1067–1078.
- [158] Verordnung (EU) Nr. 610/2012 der Kommission vom 9. Juli 2012 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 124/2009 der Kommission vom 10. Februar 2009 zur Festlegung von Höchstgehalten an Kokzidiostatika und Histomonostatika, die in Lebensmitteln aufgrund unverme. *Amtsblatt der Europäischen Union* 2012, 55, 1–3.
- [159] Cross-contamination of non-target feedingstuffs by semduramicin authorised for use as a feed additive - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *The EFSA Journal* 2008, 593, 1–27.
- [160] Runnqvist, H., Bak, S.A., Hansen, M., Styris have, B., et al., Determination of pharmaceuticals in environmental and biological matrices using pressurised liquid extraction-Are we developing sound extraction methods? *Journal of Chromatography A* 2010, 1217, 2447–2470.
- [161] Stahnke, H., Kittlaus, S., Kempe, G., Alder, L., Reduction of matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry by dilution of the sample extracts: how much dilution is needed? *Analytical Chemistry* 2012, 84, 1474–82.
- [162] Ferrer, C., Lozano, A., Agüera, A., Girón, A.J., Fernández-Alba, A.R., Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *Journal of chromatography A* 2011, 1218, 7634–9.
- [163] Pascoe, R., Foley, J.P., Gusev, A.I., Reduction in Matrix-Related Signal Suppression Effects in Electrospray Ionization Mass Spectrometry Using On-Line Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry* 2001, 73, 6014–6023.

- [164] Max-Rubner-Institut, Die Nationale Verzehrsstudie Zwei - Abschlussbericht Teil 2 2007, [http://www.mri.bund.de/fileadmin/Institute/EV/NVSII\\_Abschlussbericht\\_Teil\\_2.pdf](http://www.mri.bund.de/fileadmin/Institute/EV/NVSII_Abschlussbericht_Teil_2.pdf).
- [165] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit - Jahresbericht 2011 zum Nationalen Rückstandskontrollplan (NRKP) 2011, [http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01\\_Lebensmittel/08\\_nrkp\\_erkp/lm\\_nrkp\\_2011\\_tabellen.pdf?\\_\\_blob=publicationFile&v=2](http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/01_Lebensmittel/08_nrkp_erkp/lm_nrkp_2011_tabellen.pdf?__blob=publicationFile&v=2).

**Abbildungsverzeichnis**

1	chemische Kokzidiostatika . . . . .	4
2	ionophore Kokzidiostatika . . . . .	5
3	Nigericin . . . . .	13
4	Strukturformeln von a) Carbadox und b) Olaquinox . . . . .	15
5	ESI . . . . .	18
6	linIontrap . . . . .	19
7	PCI . . . . .	22
8	Ovarien . . . . .	23
9	Carry-over von Lasalocid, Salinomycin und Monensin: Korrelation der Konzentrationen im Futtermittel und der resultierenden Konzentration im Ei [37] . . . . .	24
10	Std-Mix . . . . .	26
11	StrataX . . . . .	31
12	Oasis . . . . .	32
13	SEC . . . . .	33
14	Mad . . . . .	34
15	HybridSPE . . . . .	35
16	Cross-Riffling . . . . .	47
17	Matrixeffekte verschiedener Futtermittelextrakte auf Kokzidiostatika – Vergleich verschiedener Lösungsmittel zur Extraktion im Überkopfschütt- ler, im Ultraschallbad und mit ASE . . . . .	48
18	Matrixeffektprofile von Decoquinat in Futtermittelextrakten verschiede- ner Extraktionstechniken und -lösungsmittel . . . . .	49
19	Matrixeffektprofile von Nicarbazin in Futtermittelextrakten verschiedener Extraktionstechniken und -lösungsmittel . . . . .	50
20	Vergleich verschiedener Lösungsmittel zur Schüttelextraktion von Madu- ramicin aus Futtermittel anhand von Wiederfindung, Matrixeffekt und Prozesseffizienz . . . . .	51
21	Vergleich verschiedener Lösungsmittel für die ASE von CBX und OQX aus Futtermittel anhand von Wiederfindung, Matrixeffekt und Prozesseffizienz	52
22	Vergleich verschiedener Lösungsmittel für die Ultraschallextraktion (USE) von CBX (a) und OQX (b) aus Futtermittel anhand von Wiederfindung, Matrixeffekt und Prozesseffizienz . . . . .	52
23	Matrixeffektprofile für CBX in Futtermittelextrakten - Vergleich verschie- dener Lösungsmittel für die ASE und Ultraschallextraktion . . . . .	53
24	Matrixeffektprofile der positiv ionisierten Kokzidiostatika in Futtermitte- lextrakt . . . . .	54
25	Matrixeffektprofile der negativ ionisierten Analyten und internen Stan- dards in Futtermittelextrakt . . . . .	55
26	Matrixeffektprofile ausgewählter Kokzidiostatika in Gesamteiextrakt . . .	56
27	Matrixeffektprofile von CBX und OQX in Futtermittelextrakt . . . . .	56

---

28	Matrixeffektprofile von Decoquinat in Eiweiß-, Eigelb-, Gesamtei- und Futtermittel-Extrakt . . . . .	57
29	Matrixeffektprofile von Maduramicin in Eiweiß-, Eigelb- und Futtermitt- telextrakt . . . . .	58
30	Matrixeffektprofile von CBX in Extrakten verschiedener Futtermittel . . .	59
31	Matrixeffektprofile von Maduramicin und Nigericin im Extrakt von fri- ischem und 3 Monate altem Eigelb . . . . .	60
32	Matrixeffektprofile von CBX in Futtermittlextrakten nach Entfettung durch LLE mit verschiedenen unpolaren Lösungsmitteln . . . . .	61
33	Matrixeffekte auf Nicarbazin, Decoquinat, Semduramicin und Madura- micin in Futtermittlextrakt nach Reinigung mittels dSPE PSA C18 und dSPE PSA Envi Carb - Vergleich von verschiedenen Matrixstärken im En- dextrakt bei 6 ml Extrakt, sowie von 3 ml und 6 ml Extrakt bei gleicher Matrixstärke . . . . .	62
34	Matrixeffektprofile von Nicarbazin und Decoquinat in Futtermittlextrakt ohne Aufreinigung und nach dispersiver SPE . . . . .	63
35	Matrixeffektprofile von Monensin und Semduramicin in Futtermittlex- trakt ohne Aufreinigung (roh) und nach dispersiver SPE . . . . .	64
36	Wiederfindung von Kokzidiostatika in Eiweiß- und Gesamteixtrakt nach dSPE PSA ENVI Carb und dSPE PSA C18 und ohne dSPE . . . . .	64
37	Matrixeffekte auf Kokzidiostatika in Eiweiß- und Gesamteixtrakt nach dSPE PSA ENVI Carb und dSPE PSA C18 und ohne dSPE . . . . .	65
38	Matrixeffektprofile von Decoquinat in Eiweiß-, Eigelb- und Gesamtei- Extrakt nach dispersiver SPE . . . . .	66
39	Matrixeffektprofile ausgewählter Kokzidiostatika in Gesamteixtrakt nach dispersiver SPE . . . . .	67
40	Wiederfindungsraten und Matrixeffekte ausgewählter Kokzidiostatika im Extrakt dotierten Futtermittels nach Strata X Polymer SPE bei verschie- denen Matrixstärken . . . . .	67
41	Wiederfindungsraten und Matrixeffekte ausgewählter Kokzidiostatika im Extrakt dotierten Futtermittels nach Oasis HLB SPE . . . . .	68
42	Matrixeffektprofile von Nicarbazin und Decoquinat in Futtermittlextrakt nach Schüttelextraktion und SPE . . . . .	69
43	Matrixeffektprofile von CBX in Futtermittlextrakt nach ASE und Oasis HLB SPE . . . . .	70
44	Matrixeffektprofile von Maduramicin und Nigericin in unbehandeltem Ei- gelbextrakt und nach Hybrid SPE . . . . .	70
45	Matrixeffekt einer Futtermittelprobe auf ausgewählte Kokzidiostatika nach Fraktionierung mittels Größenausschluss . . . . .	71
46	Matrixeffektprofile von Decoquinat und Monensin in Futtermittlextrakt nach Fraktionierung mittels Größenausschluss . . . . .	72
47	Wiederfindung, Matrixeffekt und Prozesseffizienz von CBX und OQX in verdünnten Futtermittlextrakten mit Verdünnungsfaktoren 2, 5 und 10 und unverdünnt . . . . .	73

---

48	Exogene Matrixeffekte – Matrixeffekte auf ausgewählte Kokzidiostatika in Acetonitril nach dSPE . . . . .	74
49	Matrixeffektprofile von CBX in Reagenzien der ASE mit ACN+ 2 % Ameisensäure mit und ohne anschließende SPE . . . . .	75
50	Matrixeffekte an verschiedenen LC-MS/MS-Geräten auf ausgewählte Kokzidiostatika in SEC-fraktioniertem Futtermittelextrakt . . . . .	76
51	Matrixeffektprofile von Decoquinat und Maduramicin in SEC-fraktioniertem Futtermittelextrakt gemessen an zwei LC-MS/MS-Geräten . . . . .	77
52	Matrixeffektprofile von Monensin gemessen als Ammonium-Addukt und als Natrium-Addukt in Eigelb- und Gesamteiextrakt . . . . .	78
53	Matrixeffektprofile von Nicarbazin in Gesamteiextrakt nach dSPE unter Verwendung verschiedenen C8-HPLC-Säulen . . . . .	78
54	Matrixeffektprofile von CBX in Futtermittelextrakt unter Verwendung verschiedener HPLC-Säulen . . . . .	79
55	Matrixeffektprofile von Maduramicin und Nigericin in Eiweiß- und Futtermittelextrakt . . . . .	80
56	Matrixeffektprofile von Nicarbazin und den internen Standards Dinitrocarbanilid-d <sub>8</sub> und Dinitrocarbanilid- <sup>13</sup> C <sub>12</sub> in Futtermittelextrakt (Acetonitril) . . . . .	81
57	Chromatogramm einer dotierten Futtermittelprobe . . . . .	85
58	Henne in Legebox, Vorrichtung zur Entnahme der Eier . . . . .	98
59	Maduramicin-Gehalte in Kontrollproben und Restfutter (1. Teilversuch) . . . . .	101
60	Maduramicin-Gehalte in Kontrollproben und Restfutter (2. Teilversuch) . . . . .	102
61	Maduramicin-Gehalte in Kontrollproben und Restfutter (3. Teilversuch) . . . . .	103
62	Mittlere Maduramicin-Konzentrationen in den vor der Fütterung aus den Tagesrationen entnommenen Kontrollproben, im Restfutter und in den nach Homogenisierung entnommenen Futtermittelproben . . . . .	105
63	Verlauf der Maduramicin-Konzentration in Eigelb im 1. Teilversuch . . . . .	108
64	Verlauf der Maduramicin-Konzentration in Eigelb im 2. Teilversuch . . . . .	109
65	Verlauf der Maduramicin-Konzentration in Eigelb im 3. Teilversuch . . . . .	109
66	Verlauf der Maduramicin-Konzentration im Gesamtei im 1. Teilversuch . . . . .	111
67	Verlauf der Maduramicin-Konzentration im Gesamtei im 2. Teilversuch . . . . .	111
68	Verlauf der Maduramicin-Konzentration im Gesamtei im 3. Teilversuch . . . . .	112
69	Korrelation der verabreichten Maduramicin-Konzentration im Futtermittel zur Maduramicin-Konzentration im Gesamtei im Gleichgewichtszustand für die drei Annahmen der aufgenommenen Maduramicin-Menge . . . . .	114



## Tabellenverzeichnis

1	Toxikologische Grenzwerte für Kokzidiostatika . . . . .	7
2	Höchstgehalte für Kokzidiostatika in Futtermitteln für Nicht-Zieltierarten und in Lebensmitteln . . . . .	9
3	Zur Extraktion von Kokzidiostatika aus Futtermitteln getestete Extrak- tionsmethoden und Extraktionslösungsmittel . . . . .	28
4	ASE-Methode zur Extraktion von Kokzidiostatika aus Futtermitteln . . .	29
5	ASE-Methode zur Extraktion von CBX und OQX aus Futtermitteln . . .	37
6	Konzentration der Analyten im Standard-Mix entsprechend der festgeleg- ten Höchstgehalte (HG) im Futtermittel . . . . .	40
7	Matrixkalibrierreihe - Konzentration der Kalibrierpunkte in % der Höchst- gehalte (HG) und dafür auf Blankfuttermittel dotierte Volumina des Standard-Mixes . . . . .	41
8	Linearität des Arbeitsbereiches* der Kokzidiostatika-Multimethode (Reststandardabweichung der Kalibrierfunktionen 1. und 2. Ordnung, Mandel-Anpassungstest) . . . . .	86
9	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Kokzidiostatika-Multimethode nach DIN ISO 32645 (Kalibriergeradenmethode) [144] . . . . .	87
10	Mittlere Wiederfindungsraten der Kokzidiostatika-Multimethode in do- tiertem Futtermittel bei 80 %, 100 % und 110 % des HG (n=5) . . . . .	88
11	Präzision der Multimethode unter Wiederholbedingungen - Intraday-Va- riationskoeffizienten in dotiertem Futtermittel (80 %, 100 % und 110 % der HG*), n=5 . . . . .	88
12	Präzision der Multimethode unter Zwischenbedingungen - interday-Vari- ationskoeffizienten in dotiertem Futtermittel (80%, 100 % und 110 % der Höchstgehalte*), n=5, 2 Tage . . . . .	89
13	Wiederholbarkeit der Kokzidiostatika-Multimethode (F-Test) . . . . .	90
14	Einfluss des Bearbeiters auf die Robustheit der Multimethode (F-Test) . .	91
15	Reststandardabweichungen der Kalibrierfunktionen 1. und 2. Ordnung von Maduramicin in Eiweiß, Eigelb und Futtermittel (lineare und qua- dratische Kalibrierfunktion) . . . . .	92
16	Linearität des Arbeitsbereiches der Maduramicin-Methode (Mandel-An- passungstest) . . . . .	92
17	Nachweis- und Bestimmungsgrenzen und Kenndaten der Matrixkalibrier- funktionen von Maduramicin in Eiweiß, Eigelb und Futtermittel . . . . .	93
18	Wiederfindung von Maduramicin in Eiweiß und Eigelb . . . . .	93
19	Präzision der Maduramicin-Methode in Eigelb unter Wiederhol- und Zwi- schenbedingungen . . . . .	94
20	Einfluss des Bearbeiters auf die Robustheit der Maduramicin-Methode . .	96
21	Zusammensetzung des Basisfutters TÜK-TÜK (Legehennenfutter Type 072) . . . . .	99
22	Homogenitätsprüfung der Maduramicin-Vormischung . . . . .	100
23	Analyse der Homogenitätsproben der 3 Futtermittelmischungen . . . . .	100

24	Grenzen der zweiseitigen Qualitätskontrollkarte (Shewart Control Chart) über die Wiederfindungsraten bei der Analyse der Futtermittelproben . .	104
25	Grenzen der zweiseitigen Qualitätskontrollkarte (Shewart Control Chart) über die Wiederfindungsraten bei der Analyse der Eigelbproben . . . . .	110
26	Ermittelte Carry-over-Raten in den drei Teilversuchen . . . . .	113
27	Berechnung der Konzentration von Kokzidiostatika im Ei bei Aufnahme des Höchstgehaltes (HG) im Futtermittel (FM) . . . . .	115
28	HPLC-Parameter der Kokzidiostatika-Multimethode (API 4000) . . . . .	126
29	Multi Reaction Monitoring MRM-Übergänge API 4000 . . . . .	127
30	Declustering Potential (DP), Entrance Potential (EP), Collision Cell Exit Potential (CXP) für die MRM-Übergänge (API 4000) . . . . .	127
31	Ionisations- und MS-Parameter der Kokzidiostatika-Multimethode (API 4000) . . . . .	129
32	HPLC-Parameter Kokzidiostatika-Multimethode am TSQ Vantage . . . . .	129
33	Selected Reaction Monitoring (SRM) – Übergänge (TSQ Vantage) . . . . .	130
34	S-Lens-Spannung, Collision Energy (CE), Dwelltime der Kokzidiostatika-Multimethode (TSQ Vantage) . . . . .	130
35	Ionisation- und MS-Parameter der Kokzidiostatika-Multimethode (TSQ Vantage) . . . . .	132
36	HPLC-Parameter der Maduramicin-Methode . . . . .	132
37	MRM-Übergänge der Maduramicin-Methode und zugehörige Einstellungen des Declustering Potential (DP), Entrance Potential (EP) und Collision Cell Exit Potential (CXP) . . . . .	133
38	Ionisations- und MS-Parameter der Maduramicin-Methode . . . . .	133
39	Zusammensetzung des Gradienten für die Ascentis Express C18-Säule . .	134
40	Zusammensetzung des Gradienten für die Luna Aqua C18-Säule . . . . .	134
41	Zusammensetzung des Gradienten für die HILIC-Säule . . . . .	134
42	MRM-Übergänge und zugehörige Parameter Declustering Potential (DP), Entrance Potential (EP), Collision Cell Exit Potential (CXP) und Dwelltime für CBX und OQX . . . . .	135
43	Ionisations- und MS-Parameter für CBX und OQX . . . . .	135

## Publikationsliste

### Peer review Artikel

D. Bodi, H. Fry , H. Schafft , M. Lahrssen-Wiederholt , A. Preiss-Weigert, Carryover of Maduramicin from Feed Containing Cross-Contamination Levels into Eggs of Laying Hens, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60 (28), pp 6946–6952

D. Bodi, C. Ringling, C. Schödel, A. Preiß-Weigert, H. Fry, Investigation of Matrix Effects on the Determination of Carbadox and Olaquinox in Feed by LC-MS/MS, *Chromatographia*, 2013, 76 (11-12), 651-662

### Poster

D. Bodi, H. Fry, A. Preiß-Weigert, A. Hiller, K. Mietle, R. Wittkowski, Entwicklung von Nachweismethoden für Kokzidiostatika in verschiedenen Matrices zur Untersuchung des Carry-over, 36. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Nürnberg 2007

D. Bodi, H. Fry, A. Preiß-Weigert, Entwicklung einer Methode zum Nachweis von Kokzidiostatika in Ei und Futtermittel zur Untersuchung des Carry-over, 119. VDLUFA-Kongress, Göttingen 2007

D. Bodi, H. Fry, A. Preiß-Weigert, Untersuchung von Matrixeffekten bei der LC-MS/MS-Analyse von Kokzidiostatika in Futtermitteln und Ei, 38. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Berlin 2009

D. Bodi, H. Fry, H. Schafft, A. Preiß-Weigert, Transfer von Maduramicin aus dem Futtermittel in das Ei, 122. VDLUFA-Kongress, Kiel 2010 und 39. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Stuttgart-Hohenheim 2010

D. Bodi, H. Fry, H. Schafft, M. Lahrssen-Wiederholt, A. Preiß-Weigert, Development, validation and application of LC-MS/MS methods for the investigation of Maduramicin carry over from layer feed into eggs, EuroResidue VII Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food, Egmond aan Zee 2012

### **Vorträge**

D. Bodi, H. Fry, A. Preiß-Weigert, Development of a Method for the Determination of Ten Coccidiostats in Eggs and Feed Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, 3rd International Symposium on Recent Advances in Food Analysis, Prag 2007

D. Bodi, H. Fry, A. Preiß-Weigert, Nachweis von 10 Kokzidiostatika in Futtermittel und Ei, Treffen der Fachgruppe VI Projektgruppe LC-MS des VDLUFA, Stade 2007

D. Bodi, H. Fry, A. Preiß-Weigert, Matrixeffekte bei der Analyse verschiedener Zusatzstoffe in Futtermitteln mit LC-MS/MS, Workshop des NRL für Zusatzstoffe in der Tierernährung, Berlin 2009

D. Bodi, H. Fry, A. Preiß-Weigert, HPLC-ESI-MS/MS-Methoden zur Untersuchung des Transfers von Maduramicin aus dem Futtermittel in das Ei, 123. VDLUFA-Kongress, Speyer 2011

D. Bodi, H. Fry, H. Schafft, M. Lahrssen-Wiederholt, A. Preiß-Weigert, Carry-Over of Anticoccidial Feed Additives from Feed at Cross-Contamination Levels into Eggs, BIT's 2nd Annual World Congress of Food Science and Technology, Hangzhou 2013

## Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche gekennzeichnet. Abbildungen, die anderen Quellen unverändert entnommen oder diesen entlehnt wurden, sind mit der Quellenangabe versehen.

Ich versichere, dass ich mich nicht anderweitig um einen Doktorgrad beworben habe oder einen entsprechenden Dokortitel besitze. Die Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin habe ich gelesen und akzeptiert.

Berlin,

Dorina Bodi



## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulrich Panne und Prof. Dr. Reiner Wittkowski für die Begutachtung der Dissertation.

Frau Dr. Angelika Preiß-Weigert danke ich für die Bereitstellung des Themas, die Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung in jeder Hinsicht während der Praxis- und der Schreibphase. Ich danke Hildburg Fry herzlich für die Betreuung der Arbeit, für die Möglichkeit so viel lernen zu können und für das Vertrauen in meine Fähigkeiten, eigene Ideen umzusetzen.

Meinen lieben Kolleginnen und Kollegen danke ich für die Einführung in die analytische Arbeit und insbesondere Andy Barheine, Angelika Hiller und Kerstin Mietle für die große Hilfe bei den Analysen. Vor allem möchte ich mich aber bei allen Kollegen für die schöne gemeinsame Zeit und das herzliche Klima bedanken, der Spaß kam neben der Arbeit nie zu kurz!

Den Mitarbeitern des BfR-Versuchsguts, Frau Lochotzke, Frau Thonert und Frau Hellwig, danke ich herzlich für die Durchführung des Fütterungsversuches, für die hervorragende Arbeit bei der Probennahme und Homogenisierung der Eiprobe. Herrn Dr. Helmut Schafft und Herrn Dr. Markus Spolders danke ich für die Unterstützung der Arbeit aus dem Blickwinkel der Tierernährung und der Tiergesundheit.

Mein aufrichtiger Dank gilt Friederike Wöhrlin, Anja These und auch Christoph Gottschalk für die moralische Unterstützung und Motivation in allen Phasen der Arbeit. Meinen späteren Kollegen danke ich für die Geduld und die Bereitschaft mit meiner beschränkten Einsatzfähigkeit Vorlieb zu nehmen.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern, meiner Familie, meinen Freunden und meinem Freund Andreas für die grenzenlose Geduld und Unterstützung, nicht nur während dieses Lebensabschnittes, danken.